

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

**Biología estructural de máquinas moleculares de reciclaje de
peptidoglicano: implicaciones en mecanismos de resistencias a
antibióticos**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Cecilia Artola Recolons

Director

Juan Antonio Hermoso Domínguez

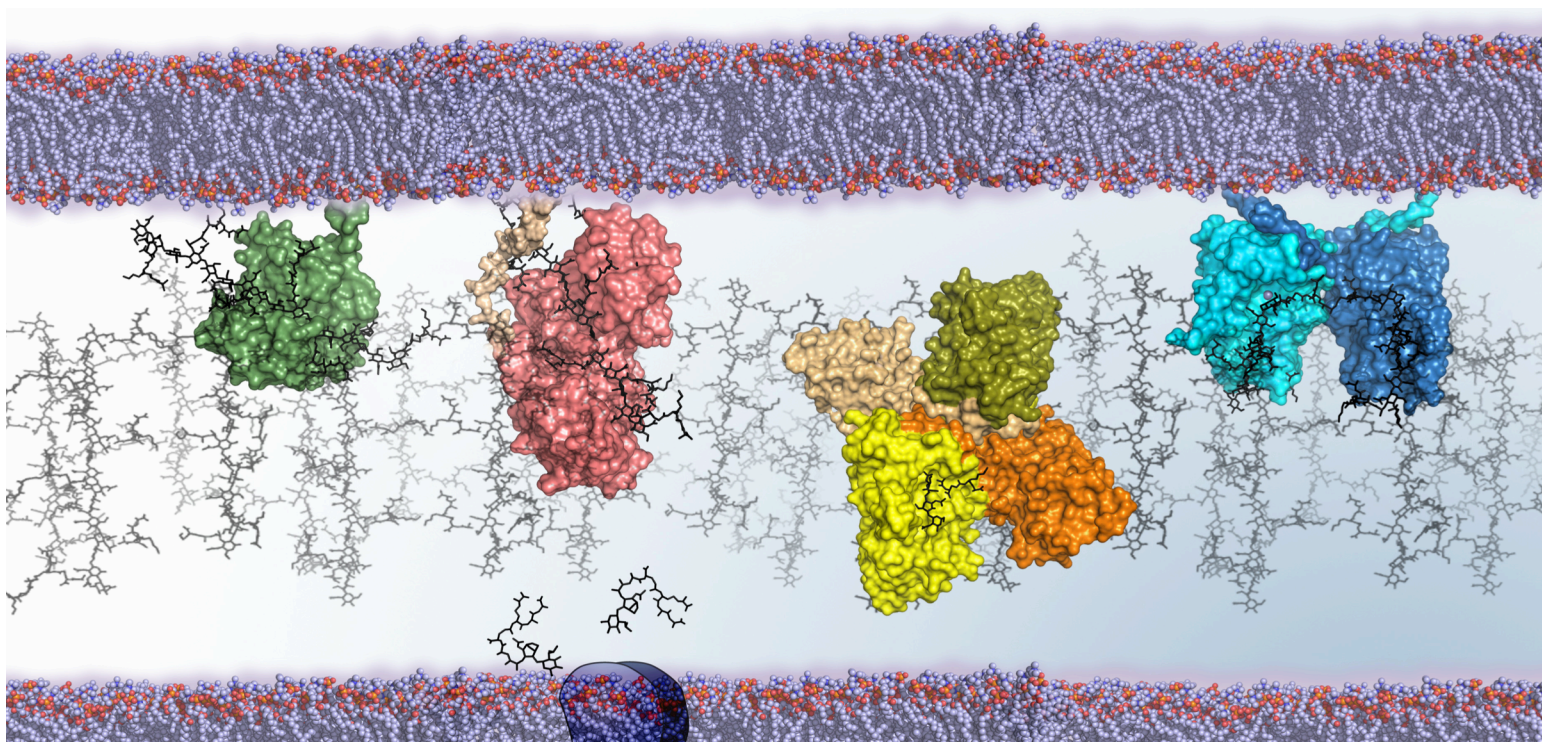
Madrid, 2014

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**Biología Estructural de Máquinas Moleculares de
Reciclaje de Peptidoglicano. Implicaciones en
Mecanismos de Resistencias a Antibióticos.**

Tesis Doctoral
Cecilia Artola Recolons

Instituto de Química-Física Rocasolano
Departamento de Cristalografía y Biología Estructural
Consejo Superior de Investigaciones Científicas



**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR**

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**Biología Estructural de Máquinas Moleculares de
Reciclaje de Peptidoglicano. Implicaciones en
Mecanismos de Resistencias a Antibióticos.**



**Memoria presentada por Cecilia Artola Recolons para
optar al grado de Doctor.**

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Cristalografía y Biología Estructural del Instituto de Química-Física "Rocasolano" (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC) bajo la dirección del Dr. Juan Antonio Hermoso Domínguez (Profesor de Investigación), miembro del Departamento de Cristalografía y Biología Estructural del Instituto de Química-Física "Rocasolano" (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC)

MADRID, 2014.

El Dr. Juan A. Hermoso, Profesor de Investigación del Departamento de Cristalografía y Biología Estructural del Instituto de Química Física “Rocasolano” (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC) certifica que:

Doña Cecilia Artola Recolons, Licenciada en Química por la Universidad de Oviedo, ha realizado bajo mi dirección el trabajo titulado “Biología Estructural de máquinas moleculares de reciclaje de peptidoglicano. Implicaciones en mecanismos de resistencias a antibióticos”, en el Departamento de Cristalografía y Biología Estructural del Instituto de Química Física “Rocasolano” (Consejo Superior de Investigaciones Científicas, CSIC).

En mi opinión, este trabajo reúne las condiciones exigidas por la legislación vigente y tiene la originalidad, el rigor y la calidad científica necesarios y suficientes para ser presentado por Doña Cecilia Artola Recolons para optar al Grado de Doctor en Química por la Universidad Complutense de Madrid.

Para que así conste y con los efectos oportunos, firmo el presente certificado.

En Madrid, a de de 2014

Juan A. Hermoso

Profesor de Investigación CSIC

Esta Tesis fue realizada gracias a la concesión de una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) (BES-2009-026676) a Cecilia Artola Recolons durante el periodo comprendido entre Septiembre de 2009 y Septiembre 2013, por parte del Ministerio de Educación.

The Spanish Ministry of Education awarded Cecilia Artola Recolons with a “Formación de Personal Investigador” (FPI) fellowship (BES-2009-026676) from September 2009 to September 2013, to develop this Thesis.

El Ministerio de Economía y Competitividad concedió a Cecilia Artola Recolons una beca para realizar una estancia breve en la Universidad de Notre Dame (In, USA) bajo la tutela del Profesor Shahriar Mobashery, entre Mayo-Julio de 2012.

The Ministry of Economy and Competitiveness awarded Cecilia Artola Recolons with a grant to do a short-research stay in the University of Notre Dame (In, USA), under the direction of Professor Shahriar Mobashery, between the months of May-July, 2012.

A mis padres

AGRADECIMIENTOS.

En este apartado tan emotivo de la Tesis me gustaría agradecer a todas las personas que han contribuido de alguna manera a este trabajo, ya sea “en el campo de batalla” o animando desde fuera.

En primer lugar me gustaría dar las infinitas gracias a mi director de Tesis, el Dr. Juan A. Hermoso. Gracias por haber confiado en mí y por haber conseguido hacer de mí una científica. Miro hacia atrás y me parece imposible asumir todo lo que he aprendido en estos casi cinco años, y también me doy cuenta de que jamás habría llegado hasta aquí si no hubiese sido por ti, por cómo eres y cómo trabajas. A pesar de alguna mentirijilla sin intención (es más, casi convencida), con toda tu paciencia has sabido desarrollar mi pensamiento científico y crítico. Creo que voy a tardar mucho en olvidar todas las bromas y risas de estos años. Y a pesar de que no me creas, e incluso si algún lejano día te tengo que dejar, sé que muy pocos jefes voy a encontrar como tú.

En segundo lugar, aunque no menos importante, me gustaría agradecer al Dr. Martín Martínez Ripoll, sin el cual yo no estaría escribiendo esta Tesis. Gracias por haberme acercado aquí y por darme la oportunidad de entrar en este departamento. Te agradezco también todas tus valiosas enseñanzas, que me hacen ser consciente de lo muchísimo que me queda por aprender en este complicado mundo de la Cristalografía.

Este trabajo no habría sido lo que es ahora sin la fundamental colaboración del Dr. Shahriar Mobashery, de la Universidad de Notre Dame (In, EEUU). Me gustaría agradecerle su hospitalidad durante mi estancia allí y su constante preocupación sobre “cómo van las cosas”. A pesar de los momentos duros de trabajo, su motivación constante hace saborear con más ganas la recompensa.

También me gustaría dar las gracias a todos los investigadores principales del Departamento de Cristalografía y Biología Molecular del “Rocasolano”, por su apoyo y su ayuda en este tiempo. Armando, Julia, Josemi, Bea, Lourdes, MJ... ha sido un placer trabajar con vosotros.

Por supuesto, no me quiero olvidar de todos los compañeros y amigos que he hecho aquí.

Como no podía ser de otra manera, tengo que empezar por Noelia. Querida Noe, no hay palabras suficientes que agradezcan todo este tiempo que hemos pasado juntas. Tú has sido lo más cercano a una “gemela” que he tenido nunca. Cuando nos conocimos y nos metimos en una convivencia extrema en Sevilla no pensé que me llevaría una AMIGA como tú. Haces que me apetezca venir a trabajar. No he encontrado una forma de darte las gracias que sea más verdad que esta.

A mi querida amiga Tere. Cómo nos podemos llevar tan bien si no tenemos nada en común... Esta es la pregunta que más he oído en estos dos últimos años. Y yo pienso... ¿nada? Cinco años en la Facultad de Químicas, un grupo de amigas que sin

ella no sería lo mismo, un montón de tardes, risas, cafés, cañas, enfados, desenfadados, gritos, abrazos y besos... ¿y eso no es nada? ¡Y encima unos años después nos vemos trabajando juntas! Para mantener las cañas y las risas pero instaurar los desayunos en la cafe.... Uhmhhh!! Gracias Tere, porque vas a ser la única que se lea esta Tesis.

Cómo dejar de agradecer a “mi posdoc” Sergio. Si sé lo que es un posdoc es gracias a ti. Y no sólo por la ciencia que he aprendido contigo, que ha sido más que con nadie, sino por toda la compañía, las vueltas a casa, la información prohibida, la paciencia infinita y aceptar ser diana de nuestras bromas con frecuencia. Pero por favor, Sergio... ¿Podrías en algún momento dejar de tener razón?

Es imposible pararme a agradecer uno por uno como he hecho hasta ahora porque, aunque tendría palabras para todos, necesitaría mucho más que estas páginas.

Empecemos por los neumos... Muchísimas gracias a todos vosotros. De todos he aprendido mucho y me habéis enseñado que trabajar en grupo siempre es más agradable. A los que se han ido ya (Noella, se te echa mucho de menos) y a las nuevas incorporaciones, gracias. En este sentido estoy muy contenta de compartir el “neumo-camino” con dos grandes científicos y mejores compañeros Iván y Rocío.

A todos mis compañeros de batalla, los que compartís conmigo el día a día, la comida, el café y la caña de los viernes: Mangi, Mercedes, Iván, Yani, Rocío, María, Elsa, Almu (desde Alemania), Ainhoa, Javi, Antonio, Marta y Cris. Os agradezco de corazón todos los momentos juntos y el apoyo constante.

Antes de terminar, no puedo dejar de dar las gracias a mi familia y amigos. Todos ellos me hacen ver a menudo que hay un mundo más allá de mis cristales y mis bacterias, y me han ayudado a afrontar esta etapa de mi vida.

En primer lugar quiero agradecer y dedicar esta Tesis a mis padres. Gracias por estar SIEMPRE a mi lado, por ser mi referencia cuando pierdo el norte. Gracias por darme ese empujón que necesito a veces para tomar decisiones, y por todos vuestros consejos y gestiones para que todo me vaya bien. Gracias por cuidarme tanto. En estos años fuera de casa habéis sido el mejor apoyo.

Gracias también a mi hermano Víctor. Está claro que solamente tú piensas que soy “la mejor” en todo. Gracias por tu apoyo y por hacer fáciles los problemas.

También un inmenso “gracias” a mis abuelos, con una mención especial a mi abuelo Esteban, por quien he heredado mi amor por la química. A mis tíos y primos.

Por supuesto, no puedo olvidarme de mis amigos. Todos y cada uno de ellos han hecho que mi vida aquí sea estupenda. Gracias por sacarme de mi mundo “freak” y aceptarme en el de la gente “normal”, para compartir conmigo las salidas, los viajes, las compras, los mercadillos y la vida social madrileña (y ovetense, por supuesto).

Después de todos estos “gracias” y esperando que no se me olvide ninguno, sólo me gustaría decir una cosa más:

Compartir este camino con vosotros ha sido un auténtico honor.

RESUMEN

La resistencia bacteriana a antibióticos es una de las amenazas más serias que afectan a la salud pública mundial. Las infecciones causadas por bacterias resistentes son cada vez más frecuentes e invasivas, y varios de estos patógenos han desarrollado resistencias a más de un antibiótico. La situación actual para aquellos pacientes con infecciones bacterianas resistentes implica tratamientos poco efectivos que alargan sus estancias hospitalarias y ponen en serio peligro su vida. En términos económicos, las consecuencias derivadas de la creciente resistencia a antibióticos generan gastos millonarios a la salud pública. Dado que la efectividad de los antibióticos es cada vez menor, la carrera en busca de nuevas alternativas terapéuticas está en marcha.

La pared celular es el blanco por excelencia para combatir infecciones bacterianas. En este trabajo se estudian varias enzimas claves en el proceso de reciclaje de la pared celular en organismos Gram-negativos y su posible utilización como dianas terapéuticas.

Las transglicosilasas líticas (LTs) son enzimas de vital importancia para la salud de la bacteria ya que son las encargadas de comenzar el proceso de reciclaje del peptidoglicano. MltE y MltC de *E. coli* son dos transglicosilasas líticas ancladas a la membrana externa y cuyo estudio se presenta en este trabajo.

MltE es una enzima puramente endolítica y su estructura cristalográfica ha demostrado que podría ser la encargada de comenzar el proceso de reciclaje de la pared celular. La estructura permite explicar los productos obtenidos previamente de forma experimental, así como el posible mecanismo de acción *in vivo* de la proteína.

MltC, por el contrario, tiene una actividad esencialmente exolítica aunque se han observado productos minoritarios procedentes de una reacción endolítica de la enzima. La estructura cristalográfica de MltC, así como la estructura en complejo con tres análogos de peptidoglicano, ha explicado estos resultados y ha sido fundamental para proponer un mecanismo de acción de la enzima *in vivo*. En este trabajo se demuestra, por primera vez, que una transglicosilasa lítica posee un mecanismo procesivo y se identifica un dominio previamente desconocido (DUF 3393) al que se le asigna una función vital para el funcionamiento de la MltC.

Pseudomonas aeruginosa es un patógeno oportunista en humanos que ha desarrollado resistencias a todos los antibióticos utilizados para combatirlo. Estudios recientes han observado que el mecanismo de resistencia de este patógeno es distinto al de otras bacterias Gram-negativas. Este cambio se atribuye a la presencia de tres amidasas AmpD, una citoplásmica común a todos los Gram-negativos, y otras dos periplásmicas, AmpDh2 y AmpDh3, cuyos productos de reacción han sido directamente relacionados con la virulencia de *P. aeruginosa*. En este trabajo se presentan estas dos nuevas amidasas: AmpDh2 y AmpDh3.

AmpDh2 es un dímero anclado a la membrana. Su estructura cristalográfica ha permitido demostrar cómo la enzima actúa sobre cadenas de peptidoglicano entrecruzadas y por primera vez se ha observado una amidasa en complejo con una cadena glicánica. Su disposición dimérica y su localización celular limitan su actividad a cadenas de peptidoglicano externas.

AmpDh3 funciona como un tetrámero no anclado a la membrana. Su estructura cristalográfica ha permitido proponer un mecanismo de acción para esta enzima *in vivo*, por el que sería capaz de introducirse en la malla de peptidoglicano y romper la parte peptídica de las cadenas desde el interior.

Las actividades de AmpDh2 y AmpDh3 son complementarias en *P. aeruginosa* y gracias a este trabajo se ha podido desvelar parte del mecanismo de resistencia a antibióticos de este peligroso patógeno.

ENGLISH SUMMARY.

The increasing bacterial resistance to antibiotics has recently become a worldwide problem. Most drugs dealing with bacterial infections, such as β -lactams or vancomycin, target peptidoglycan biosynthesis. However, the variability that can be introduced in the biosynthesis process due to the many steps involved, and the differences in the cell wall among different bacteria has resulted in a continuous resistance development of bacteria to current drugs. Therefore, it is high time we started looking for new consistent therapeutic targets to direct our research. In this sense, all enzymes involved in essential functions for bacterial survival could actually serve this purpose.

The bacterial cell wall is an elastic structure that surrounds the organism, defining the bacterial shape and preventing the high osmotic pressure held inside the cell from exploding and causing lysis. In order to maintain the health of the bacteria, there is a continuous process of synthesis and turnover of peptidoglycan. Recent studies have shown that up to 50% of the peptidoglycan is degraded per generation. Thus, understanding the recycling mechanism of peptidoglycan could certainly shed light over new drug targets.

In Gram-negative bacteria, the recycling process serves to control induction of the expression of β -lactamases. Therefore, all enzymes involved in this process are potential key targets. The first step of the recycling process is the cleavage of the saccharide bonds that conform the peptidoglycan. This work is done by the lytic transglycosylases (LTs).

LTs catalyse the non-hydrolytic fragmentation of the β -1,4-glycosidic bond between the main components of peptidoglycan, N-acetylmuramic acid (NAM) and N-acetylglucosamine (NAG). The reaction product (NAG-1,6-anhydromuramyl derivative) is internalized to the cytoplasm through the permease AmpG. Once in the cytoplasm, the glucosaminidase NagZ hydrolyses the glycosidic bond between NAG-anhydroNAM. The pool of anhydromuropeptides generated by NagZ is controlled by the amidase AmpD, which cleaves the peptide part of the substrate. Then, a series of enzymatic reactions take place until the formation of Lipid II. Once formed, Lipid II is transported to the periplasm where the formation of *de novo* peptidoglycan starts. This cycle of synthesis and recycling occurs constantly in bacteria.

LTs are critical for bacterial fitness and are involved in cleavage of localized peptidoglycan to insert flagella or secretion systems, favouring the inside/outside transport of different compounds such as DNA or toxins. They also play essential roles in the growing and cell division processes. Due to their autolytic nature their activity must be extremely controlled and regulated by the cell.

There are seven different LTs in *Escherichia coli*. Although they are all located in the periplasmic space, six of them are bound to the inner leaflet of the outer membrane (MltA-F) and only one is soluble (Slt70). Despite apparently having the same function, the X-ray structures reported up to now show severe differences,

suggesting an unknown mechanism of action among all seven or the formation of interactions with other proteins such as PBPs (Penicillin binding proteins).

This work presents the crystallographic structure of MltE, the first endoactive lytic transglycosylase ever discovered, and MltC.

Careful analysis of the three-dimensional structure of MltE showed how the protein is attached to the inner leaflet of the outer membrane. The structure has a very large groove that can accommodate up to eight sugars (defined -4, -3, -2, -1, +1, +2, +3, +4), being the catalytic Glu located in the middle of the saccharide-binding site. Molecular dynamics simulations support this finding. We were able to explain the different reaction products of MltE (mostly tetrasaccharides instead of disaccharides as the rest of LTs) and how the protein can cleave in the middle of the peptidoglycan chains, showing its endolytic activity. We have proposed MltE to be the enzyme starting the recycling process.

Another important LT in *E. coli* is MltC, which is also presented in this work. The crystallographic structure showed a modular protein, being the additional domain highly conserved in many bacteria and crucial for its function. This domain is responsible for accommodating the peptide part of peptidoglycan during the processive exolytic activity of the enzyme. What is more, the two domains of MltC enable it to accommodate up to nine saccharide sites, explaining the little endolytic activity encountered for MltC. Also, MltC is attached to the inner leaflet of the outer membrane through a mobile coiled-coil region that permits the enzyme to move around the peptidoglycan chains. This is the first time we can confirm that an LT works in a processive manner.

Taking all these findings into account and given its unique nature, it is possible to propose MltE and MltC as new efficient drug targets. Current antibiotics function on the stem peptide of peptidoglycan, in which there can be variability between different organisms, but LTs act in a unique and invariant bacterial site that does not change among different kinds of bacteria. The fact of having such a consistent substrate could result in a slow evolution of bacterial resistance.

Pseudomonas aeruginosa is a human pathogen that causes infection and generalized inflammation and sepsis. It is nowadays considered as one of the most infective pathogens along with *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter*, because of the many resistances it is involved in.

It has been shown that the penicillin resistance mechanism of *P. aeruginosa* is substantially different from the rest of Gram-negative organisms. This difference could be due to the fact that, unlike other Gram-negative bacteria, analysis of the genes of *P. aeruginosa* revealed it to possess three paralogous amidases: AmpD, AmpDh2 and AmpDh3.

As expected, AmpD is placed in the cytoplasm. However, AmpDh2 and AmpDh3 have a periplasmic localization. Although they are considered responsible for the cleavage of the peptide part in the periplasmic space, little was known about how these enzymes acted *in vivo*. Nevertheless, this work has shown a whole

mechanism of action for both proteins, explaining their specificity for the soluble or insoluble fraction of the peptidoglycan. Both enzymes appear to be involved in virulence of *P. aeruginosa*.

The crystallization of the complex of AmpDh2 and the anhydro-NAM-pentapeptide showed the enzyme stabilizing the peptide stem.

AmpDh2 acts as a dimer anchored to the inner leaflet of the outer membrane. The dimeric conformation of AmpDh2 shows two active sites available facing opposite sides. This arrangement permits the enlargement of the peptide-binding site allowing the accommodation of large segments of the peptidoglycan chains and explaining the action of AmpDh2 over cross-linked products. The localization of AmpDh2 in the cell is decisive in regulating its function. The attachment of the protein to the membrane only enables it to cleave the near peptidoglycan chains, usually smaller and easier to move. As a matter of fact, and supporting this theory, the products found for AmpDh2 are mainly from the soluble fraction of the sacculus.

The complex of AmpDh2 and a synthetic tetrasaccharide revealed, for the first time, that the active site of the amidase can also accommodate long chains of sugars.

AmpDh3, on the other hand, is not anchored to the membrane and can freely move around the periplasm. It is a tetramer in solution and in the crystal. Given its four available active sites, we have proposed a reaction mechanism based on the three-fold symmetry of the peptidoglycan backbone and the disposition and distances of the peptides that could give some evidence of the reaction products. This mechanism shows the tetramer working “in pairs”. On a first step, the two active sites facing the peptidoglycan chain bind the saccharides and perform hydrolysis of the peptides. After release of products and rotation of the tetramer 60°, the other two active sites, facing the opposite side, could align the neighboring strand for additional catalysis. Therefore, AmpDh3 could be acting as a “tunnel maker”, pivoting around the saccharide backbone of the peptidoglycan, which would allow AmpDh3 hydrolysis in a processive manner. This action could explain the preference of AmpDh3 for degrading the insoluble sacculus and the long sugar products obtained.

This hypothesis is supported by the crystallographic structures of the apo enzyme and the protein in complex with two reaction products. In this work, AmpDh3 could be observed in its active form, with both products of hydrolysis, and the inactive enzyme without Zn^{+2} ion, revealing that the cation is crucial for the activity of the protein.

With this work we conclude that both proteins AmpDh2 and AmpDh3 complement each other in the turnover and maturation of the cell wall in *P. aeruginosa*.

Understanding the relationship between cell wall recycling and antibiotic resistance has been proved essential to look for new antibiotic targets. This work shows a global view of this process and gives insights in future development of

antibiotics. The development of new therapies is critical to prevent a once-treatable disease from becoming untreatable.

As an overview of this work, we correlate the four enzymes MltE, MltC (or their homologues in *P. aeruginosa*), AmpDh2 and AmpDh3 working altogether in the periplasm of the bacteria, and performing unique activities in the peptidoglycan recycling process (Figure I).

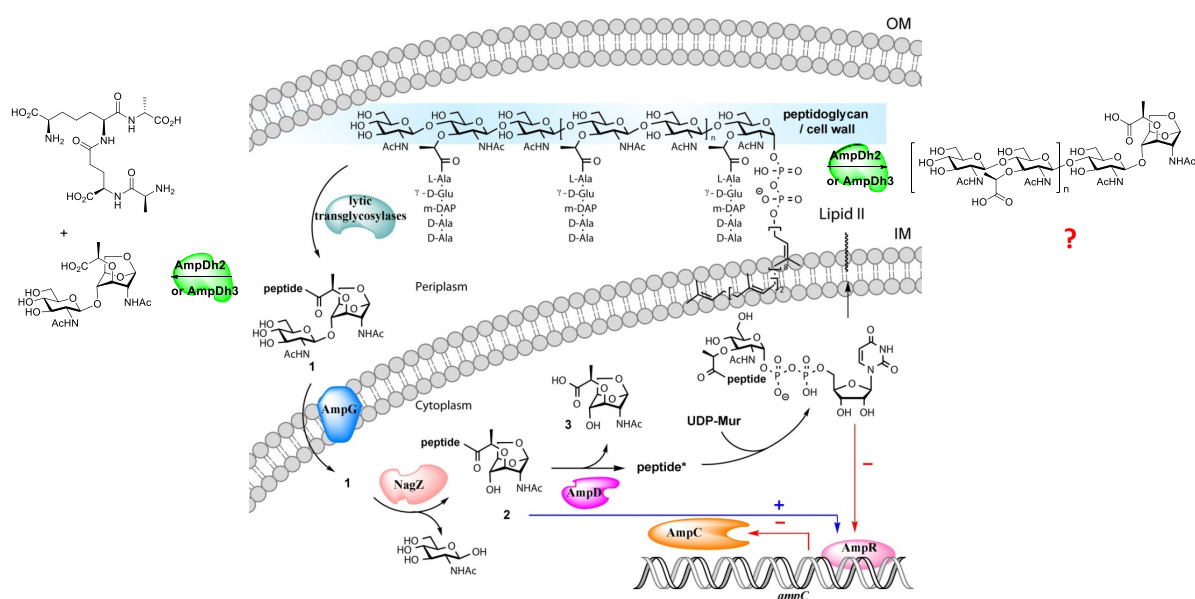


Figure I. Scheme of all the proteins involved in peptidoglycan recycling in *P. aeruginosa*.

ABREVIATURAS

AmiD: 1,6-anhidro-*N*-acetilmuramil-L-alanina amidasa periplásmica bacteriana

AmpC: enzima β -lactamasa

AmpD: 1,6-anhidro-*N*-acetilmuramil-L-alanina, amidasa citosólica bacteriana

AmpDh2: 1,6-anhidro-*N*-acetilmuramil-L-alanina amidasa periplásmica bacteriana en *P. aeruginosa*

AmpDh3: 1,6-anhidro-*N*-acetilmuramil-L-alanina amidasa periplásmica bacteriana en *P. aeruginosa*

AmpG: permeasa encargada de la internalización del muropéptido

AmpR: proteína reguladora de la expresión de AmpC

anhNAM: ácido 1,6-anhidro-*N*-acetilmurámico

APE: Orto-acetilesterasa de peptidoglicano

C-terminal: carboxilo terminal

CC: Coeficiente de correlación

DAP: ácido diaminopimélico

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético

ESRF: *European Synchrotron Radiation Facility*

HMM PBP: Proteína de unión a penicilina de alto peso molecular

LMM PBP: Proteína de unión a penicilina de bajo peso molecular

LT: *Lytic transglycosylase*, transglicosilasa lítica

MAD: *Multiple Anomalous Diffraction*, dispersión anómala múltiple

MIR: *Multiple Isomorphous Replacement*, reemplazo múltiple isomorfo

MR: *Molecular Replacement*, Reemplazo Molecular

NAG: *N*-acetilglucosamina

NagZ: β -*N*-acetilglucosaminidasa citosólica bacteriana

NAM: ácido *N*-acetilmurámico

PAT: Orto-acetiltransferasa de peptidoglicano

PG: peptidoglicano

SAD: *Single Anomalous Diffraction*, dispersión anómala simple

SLS: *Swiss Light Source*

MltE: transglicosilasa lítica anclada a membrana E

MltC: transglicosilasa lítica anclada a membrana C

UDP-NAG: Uridina difosfato *N*-acetilglucosamina

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. La pared bacteriana	4
1.2. Clasificación de las bacterias	4
1.3. Síntesis de la pared bacteriana	6
1.4. Reciclaje de la pared bacteriana	9
1.5. Las transglicosilasas líticas	11
1.6. Clasificación de las transglicosilasas líticas	12
1.7. Información estructural de las transglicosilasas líticas de <i>E. coli</i>	14
1.7.1. Slt70	15
1.7.2. MltA	16
1.7.3. MltB	17
1.8. Mecanismo de las transglicosilasas líticas	19
1.9. Control de la actividad autolítica	20
1.10. Productos de reacción de las transglicosilasas líticas	21
1.11. Las transglicosilasas líticas como dianas terapéuticas	23
1.12. Inducción de β -lactamasas y resistencia a antibióticos	23
1.13. AmpDs de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
1.14. Productos de reacción de las AmpDs de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	27
2. TÉCNICAS CRISTALOGRÁFICAS	29
2.1. CRISTALIZACIÓN	32
2.1.1. Cristales y simetría	32
2.1.2. Factores que afectan a la cristalización	33
2.1.3. Búsqueda de las condiciones de cristalización	35
2.1.4. Metodologías de Cristalización	35
2.1.5. Cristalización de complejos proteína-ligando	37
2.1.6. Preparación final de la muestra cristalina	37
2.2. DIFRACCIÓN DE RAYOS X	38
2.2.1. Fuentes de radiación y equipos de difracción	39
2.3. RESOLUCIÓN ESTRUCTURAL	40
2.3.1. Procesado de datos de difracción	40
2.3.2. El problema de las fases	42
2.3.3. Reemplazo molecular	43
2.3.4. Refinamiento estructural	44
2.3.5. Modelo manual y validación del modelo	45
2.4. OTROS PROGRAMAS UTILIZADOS	46
3. OBJETIVOS	47

TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN	51
4. ARTÍCULO 1: Crystallization and Preliminary X-ray diffraction analysis of the lytic transglycosylase MltE from <i>Escherichia coli</i>	53
4.1. Introducción al trabajo y aportación del autor	55
4.2. Publicación	57
4.3. Discusión	61
5. ARTÍCULO 2: High-Resolution Crystal Structure of an Outer Membrane-Anchored Endolytic Peptidoglycan Lytic Transglycosylase (MltE) from <i>Escherichia coli</i>	63
5.1. Introducción al trabajo y aportación del autor	65
5.2. Publicación	67
5.3. Información adicional	71
5.4. Discusión	81
6. ARTÍCULO 3: Reaction products and the X-ray structure of AmpDh2, a virulence determinant of <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	83
6.1. Introducción al trabajo y aportación del autor	85
6.2. Publicación	87
6.3. Información adicional	91
6.4. Discusión	109
7. ARTÍCULO 4: Cell-Wall Remodeling by the Zinc-Protease AmpDh3 from <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	111
7.1. Introducción al trabajo y aportación del autor	113
7.2. Publicación	115
7.3. Información adicional	119
7.4. Discusión	131
8. ARTÍCULO 5: X-Ray Structure, Reactions and Evidence for Processivity in Catalysis by the Lytic Transglycosylase MltC of <i>Escherichia coli</i>	135
8.1. Introducción al trabajo y aportación del autor	137
8.2. Publicación	139
8.3. Información adicional	151
8.4. Discusión	165
9. CONCLUSIONES	169
10. BIBLIOGRAFÍA	173

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN.

Las bacterias son los organismos celulares más sencillos. Por tratarse de células procariotas, tienen una estructura interna sin núcleo ni orgánulos membranosos internos. Presentan una cubierta protectora muy resistente, llamada pared celular, bajo la cual se encuentra la membrana plasmática que encierra el citoplasma y el ADN.

La forma de las bacterias puede ser muy diversa, desde esférica (cocos), con forma de espiral (espirilos) o de bastoncillo (bacilos), y su tamaño suele ser de unos pocos micrómetros de longitud. Para desplazarse, muchas bacterias utilizan flagelos o prolongaciones filamentosas.

Las bacterias son capaces de adaptarse y reproducirse prácticamente en cualquier tipo de hábitat, tanto terrestre como acuático. Un ejemplo de ello puede ser el organismo *Thermophilus aquaticus*, que sobrevive a temperaturas extremas de entre 50°C y 80°C, o las bacterias quimiosintéticas, que viven en las dorsales oceánicas donde existen respiraderos hidrotermales o magma, y transforman productos tóxicos en alimento y energía. Las bacterias se reproducen en condiciones óptimas con una asombrosa facilidad y rapidez, lo que hace que las poblaciones bacterianas sean enormes y que su evolución sea tan rápida que explique por qué las bacterias encuentran tan fácilmente nuevas fuentes de alimento o de resistencia a antibióticos.

Ya desde la introducción de la penicilina como agente antibacteriano en 1943 (o quizás incluso antes), las bacterias han desarrollado resistencias a todos los antibióticos utilizados para combatirlos, de modo que cualquier nueva alternativa, por eficaz que sea, ha desembocado en una nueva resistencia del patógeno en poco tiempo. Todo ello ha resultado en un problema de salud a nivel mundial en el que el desarrollo de nuevas clases de antibióticos está muy por detrás de la necesidad de nuevos fármacos.

Algunos datos revelan la envergadura del problema; el Centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC) estima que más de 25.000 pacientes mueren al año en Europa infectados por bacterias multiresistentes. De igual modo, la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA) sostiene que más de un 70% de las infecciones adquiridas en hospitales de Estados Unidos son patógenos resistentes a uno o más antibióticos. Este problema de salud lleva además asociado un problema económico, dados los gastos millonarios derivados de prolongar las estancias hospitalarias (más de 1500 millones de euros al año, sólo en Europa). La resistencia de las bacterias a los fármacos existentes se ha convertido, por tanto, en uno de los problemas más importantes de la medicina actual y que requiere de una concienciación y una acción inmediata.

La comprensión de las bases moleculares de los mecanismos de infección permite desarrollar nuevos fármacos dirigidos a inhibir procesos celulares esenciales sobre dianas únicas y específicas (Clatworthy *et al.*, 2007).

INTRODUCCIÓN

1.1. LA PARED BACTERIANA

La pared bacteriana es una estructura elástica que rodea la célula. Esta envoltura es de vital importancia para la bacteria ya que mantiene su integridad estructural. Gracias a esta pared, la célula es capaz de soportar la elevada presión osmótica que hay en su interior, manteniendo su forma característica y evitando su ruptura y desintegración.

El elemento fundamental que forma la pared bacteriana es el peptidoglicano (PG). Se trata de un polímero lineal estructurado en capas que forman una envoltura tridimensional alrededor de la membrana citoplasmática. La cadena de peptidoglicano está formada por la repetición de un disacárido: el ácido N-acetilmurámico (NAM) y la N-acetilglucosamina (NAG). Estos azúcares están conectados mediante un enlace β -(1,4)-glicosídico. Cada fragmento de NAM tiene unido una cadena peptídica, que puede contener de tres a cinco residuos, tal y como muestra la Figura 1. Las cadenas peptídicas se interconectan entre sí formando la red tridimensional, fuerte y rígida del peptidoglicano.

La secuencia específica de amino ácidos unidos al ácido N-acetilmurámico puede variar ligeramente dependiendo del tipo de bacteria. En el caso de *Escherichia coli* los péptidos están compuestos de: L-alanina, ácido D-glutámico, ácido *meso*-diaminopimélico y D-alanina. El hecho de que en la pared bacteriana existan amino ácidos en su forma D protege a la bacteria del ataque de peptidasas

y supone una ventaja evolutiva para responder a condiciones específicas del medio (Lam *et al.*, 2009; Cava *et al.*, 2010). Actualmente son muchos los antibióticos, incluyendo los β -lactámicos, que tienen como diana el peptidoglicano. Estos antibióticos inhiben la formación de la pared celular o detienen otros procesos de su ciclo de vida. En este sentido, todas las proteínas relacionadas con la formación o destrucción de la pared celular son extremadamente importantes para el desarrollo de nuevos fármacos.

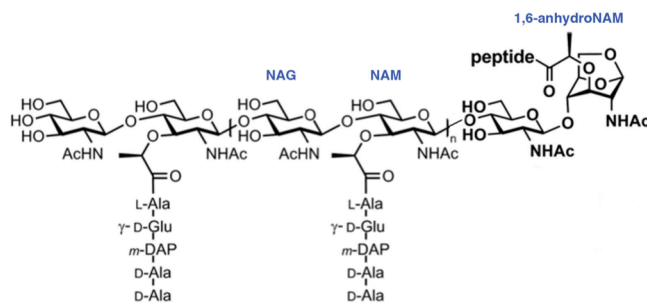


Figura 1. Esquema de la cadena de peptidoglicano en la bacteria *Escherichia coli*.

1.2. CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS

Históricamente las bacterias se han clasificado en dos grandes grupos: Gram-positivas y Gram-negativas. Este nombre se debe a los ensayos de tinción de Gram, una técnica de visualización y diferenciación que tiñe a las bacterias de morado (Gram-positivas) o de rojo (Gram-negativas). Posteriormente se demostró que esta diferencia se debía a la distinta composición de la pared celular.

En la Figura 2 se muestra de forma esquemática las diferencias entre ambas estructuras. Las bacterias Gram-positivas poseen una capa de peptidoglicano mucho más gruesa que las Gram-negativas y son capaces de retener el tinte durante la tinción de Gram.

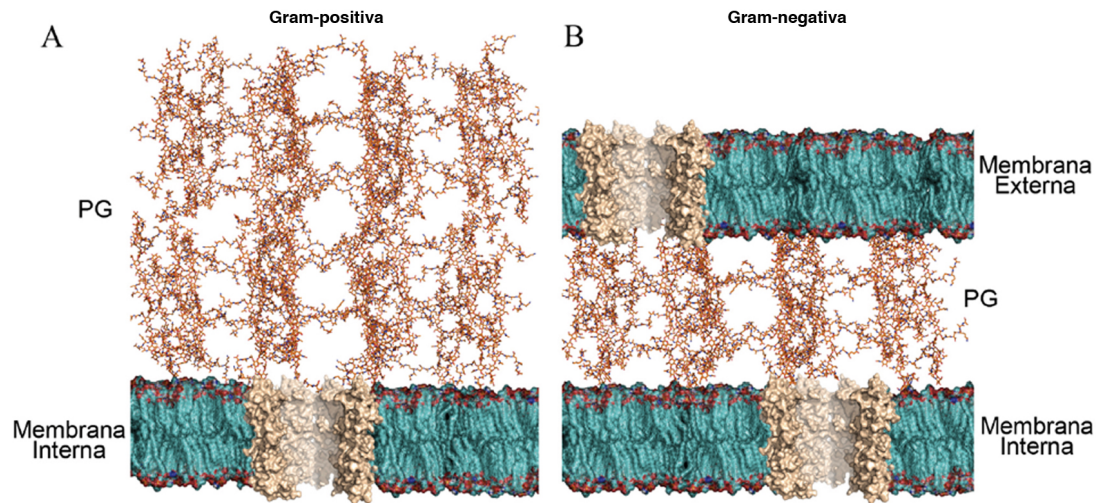


Figura 2. Diferencia entre paredes celulares de bacterias Gram-positivas (A) y Gram-negativas (B).

Las bacterias Gram-positivas, como *Streptococcus pneumoniae* o *Staphylococcus aerus*, poseen una pared celular muy gruesa, formada por múltiples capas que funcionan de exoesqueleto y que rodean la membrana citoplasmática. A pesar de carecer de membrana externa, poseen otras estructuras que simulan en cierta forma esta membrana, como son las cápsulas polisacáridas y las proteínas de superficie (S-layer) (Reith *et al.*, 2011). Una estructura característica de las bacterias Gram-positivas son los ácidos teicoicos (polisacáridos aniónicos ácidos), que forman parte de la malla del PG ya sea enganchándose al mismo mediante enlaces fosfodiéster o anclándose a la membrana lipídica (ácidos lipoteicoicos). Los ácidos teicoicos se encargan de mantener un pH ácido constante, ya que son capaces de asimilar protones que regulan el pH, regulando la actividad de las autolisinas y controlando el tránsito de cationes bivalentes como el Mg^{+2} (Weidenmaier *et al.*, 2008).

Las bacterias Gram-negativas, como *Escherichia coli* o *Pseudomonas aeruginosa*, ambas objeto de estudio en esta Tesis, se caracterizan por poseer dos membranas lipídicas, una interna (citoplasmática) y otra externa. Entre ellas se encuentra una envoltura más delgada de peptidoglicano. El espacio periplásmico es la zona confinada entre la membrana citoplasmática y la membrana externa y que contiene al PG. Al contrario que en las Gram-positivas, estas bacterias no poseen ácidos teicoicos en su PG.

Según informa el Centro Americano de Control y Prevención de Enfermedades (CDC), las bacterias Gram-negativas son patógenos especialmente preocupantes ya que se han vuelto resistentes a casi todos los fármacos existentes para su

tratamiento. Aunque la resistencia a antibióticos también ocurre en organismos Gram-positivos, el grado de resistencia sigue siendo menor que en Gram-negativos, según el CDC. Los patógenos Gram-negativos que causan mayores problemas en este sentido son *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Acinetobacter*. El tratamiento de infecciones causadas por estos organismos se ha convertido en un reto diario en los hospitales debido a las múltiples resistencias que han generado en poco tiempo.

1.3. SÍNTESIS DE LA PARED BACTERIANA

El peptidoglicano no es una estructura estática, sino que se va degradando y regenerando continuamente. Tanto la síntesis como la ruptura del PG deben estar perfectamente coordinados, ya que cualquier pérdida de la integridad de la pared celular conduciría a la lisis y posterior muerte de la bacteria. Se trata de un proceso cíclico extremadamente complejo, en el que intervienen numerosas enzimas y todas ellas juegan un papel clave en funciones específicas. A continuación se muestra la localización en el genoma de la bacteria *Escherichia coli* (cepa K12) de los genes que codifican las enzimas más importantes involucradas en este ciclo celular (Figura 3).

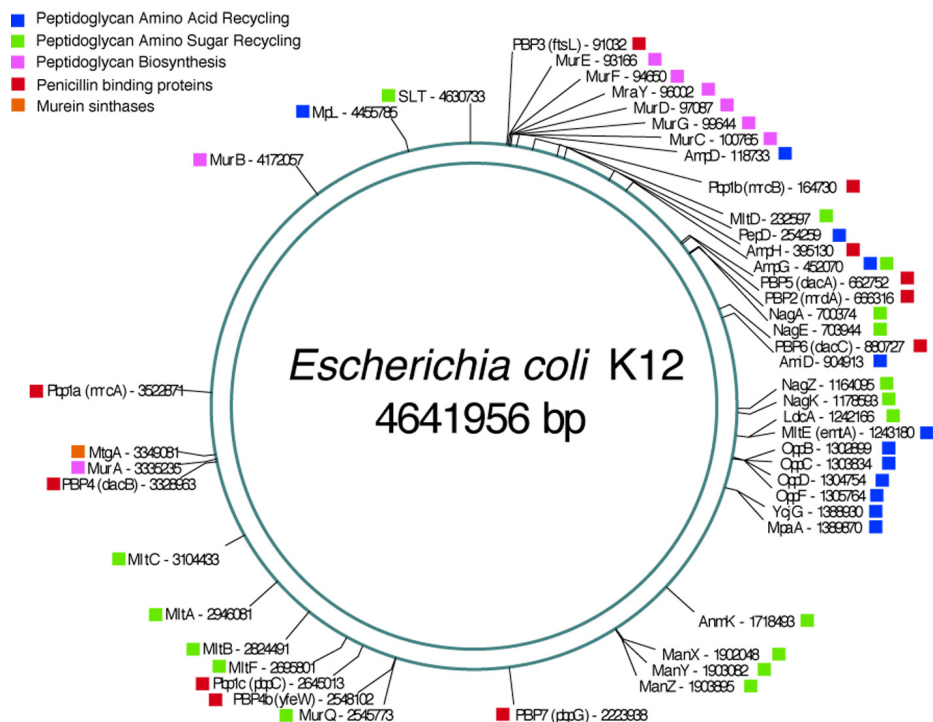


Figura 3. Localización de los genes involucrados en el proceso de síntesis o reciclaje de la pared celular de *Escherichia coli* K12. La posición exacta está indicada en pares de bases.

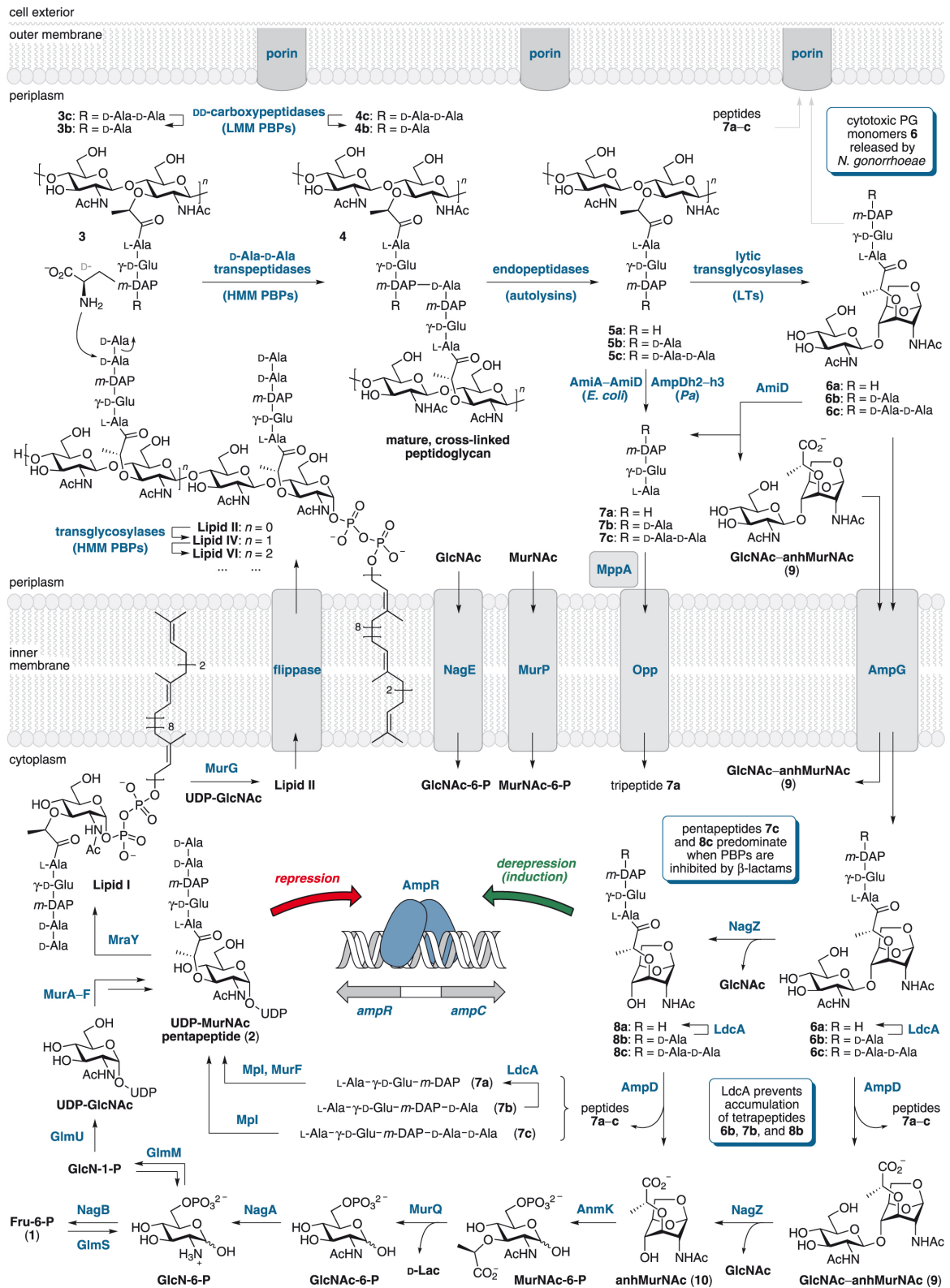


Figura 4: Visión completa de la síntesis y reciclaje del peptidoglicano en bacterias Gram-negativas (Johnson *et al.*, 2013).

INTRODUCCIÓN

La Figura 4 muestra un esquema general del proceso de ruptura y regeneración del peptidoglicano.

La síntesis de la pared celular comienza en el citoplasma con la conversión de la fructosa-6-fosfato en UDP-NAG (Uridina difosfato N-acetilglucosamina) a través de la actividad secuencial de las enzimas GlmS, GlmM, y GlmU. UDP-NAG se convierte en UDP-NAM-pentapéptido por la actividad secuencial de MurA (enolpiruvil transferasa), MurB (reductasa) y MurC-F (ligasas) que van añadiendo los péptidos (Vollmer *et al.*, 2008). En la parte citoplásmica de la membrana interna se encuentra MraY, que cataliza la reacción de UDP-NAM-pentapéptido con el undecaprenil pirofosfato para generar el Lípido I, que se acopla al fragmento NAG a través de la acción de la transferasa MurG, para obtener el Lípido II (Johnson *et al.*, 2013). Todos estos pasos ocurren en el citoplasma y pueden requerir ATP (Cava *et al.*, 2011). Una enzima de membrana (translocasa) se encarga de transportar el Lípido II desde el citoplasma hasta el espacio periplásmico. Una vez en el periplasma, el Lípido II es el disacárido a partir del cual la cadena glicánica del PG empieza a crecer (Bouhss *et al.*, 2008; Mohammadi *et al.*, 2011).

Las enzimas encargadas de formar la malla de PG son las PBPs (Penicilin Binding Proteins). Existen varios tipos de PBPs. Las HMM-PBPs (High Molecular Mass PBPs) son enzimas bifuncionales que poseen dos dominios, uno transglicosilasa y otro transpeptidasa, que les permiten llevar a cabo ambas acciones de forma independiente. Así, por una parte polimerizan las cadenas glicánicas (dominio transglicosilasa), es decir, unen los fragmentos de NAG y NAM alternativamente, mientras que el dominio transpeptidasa se encarga de entrecruzar distintas cadenas glicánicas a través de los péptidos del NAM (proceso conocido como “crosslinking” en inglés). En este caso las PBPs actúan como una D,D-transpeptidasa, uniendo el grupo carboxilo de la D-Ala en la posición 4, y el grupo amino del *m*-DAP en la posición 3 de la otra cadena. En la mayoría de organismos Gram-negativos este enlace ocurre de forma directa entre las dos cadenas, es decir, sin puentes peptídicos como ocurre en muchos organismos Gram-positivos (Höltje, 1998; Vollmer *et al.*, 2008).

El grado de transpeptidación se regula gracias a otro tipo de PBPs, las LMM PBPs (Low Molecular Mass Penicilin Binding Proteins). Estas enzimas poseen un único dominio transpeptidasa (con actividad D-Ala-D-Ala carboxipeptidasa), y tienen como único sustrato el extremo D-Ala-D-Ala del pentapéptido. Su función es eliminar el último D-Ala para que no se pueda producir el enlace cruzado entre las dos cadenas glicánicas (Figura 5A), ya que el tetrapéptido resultante no sirve como sustrato para las D-Ala-D-Ala transpeptidasas (HMM PBPs) (Sauvage *et al.*, 2008).

Tal y como su nombre indica, las PBPs interaccionan con los antibióticos β -lactámicos (Figura 5B), que actúan simulando el fragmento terminal D-Ala-D-Ala, formando un complejo covalente que inhibe la transpeptidación entre las cadenas glicánicas, y provocando la consiguiente malformación del PG (Höltje, 1998; Fisher *et al.*, 2005).

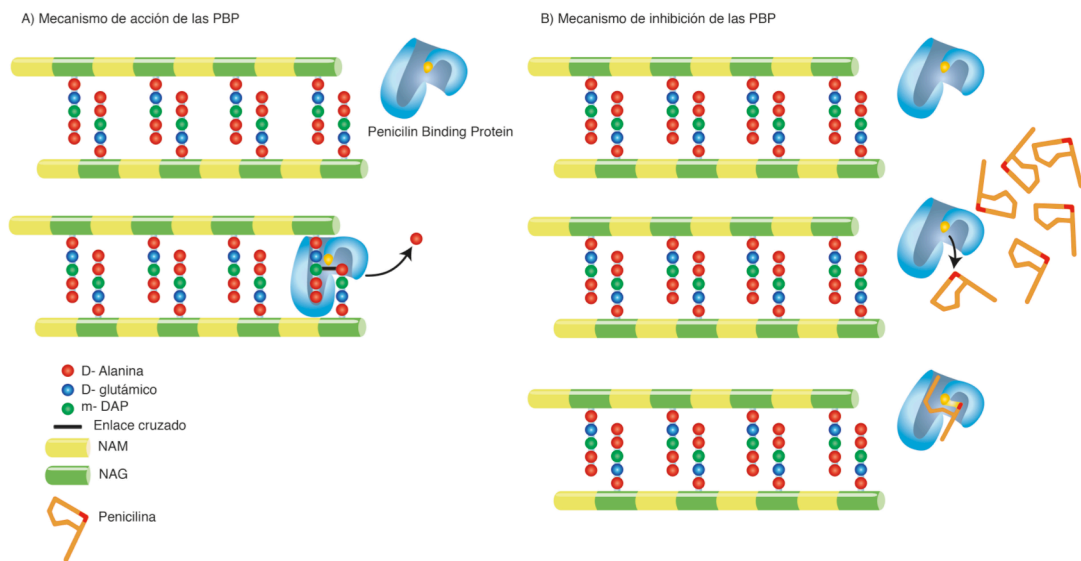


Figura 5. Mecanismo de acción de los β -lactámicos inhibiendo las PBPs.

La reacción de transpeptidación sería la última etapa en el proceso de síntesis del PG, sin embargo, la pared celular se encuentra en un constante proceso de ruptura y remodelación. A lo largo de la vida de la bacteria, más del 50% de su pared celular es reutilizada en el reciclaje del PG (Park & Uehara, 2008).

1.4. RECICLAJE DE LA PARED BACTERIANA

El reciclaje de la pared bacteriana comienza con la degradación de la pared celular. Para ello es necesaria la acción de varias autolisinas, llamadas así por su capacidad de lisis dentro de la propia bacteria si su actividad no está perfectamente controlada (van Heijenoort, 2011). Dentro de las autolisinas de *E.coli* se incluyen (Figura 6):

- Carboxipeptidasas: rompen el enlace peptídico L-Ala-L-Ala desde los extremos (LMM PBPs: PBP5 Y PBP6), formando tetrapéptidos a partir de pentapéptidos (Höltje, 1998).
- Endopeptidasas: (MepA, DacB, PBP4, PBP7) rompen el enlace cruzado que forman dos cadenas de PG desde en interior, es decir, rompen el enlace entre el D-Ala de una cadena y el m-DAP de la cadena vecina (Park & Uehara, 2008).
- Amidasas (AmiA-D, AmpD citoplasmática) rompen el enlace NAM-L-Ala, liberando la parte peptídica.
- Transglicosilasas líticas: (MltA-F, Slt70) rompen el enlace glicosídico entre NAM y NAG formando un producto característico 1,6-anhidroMurNAG.

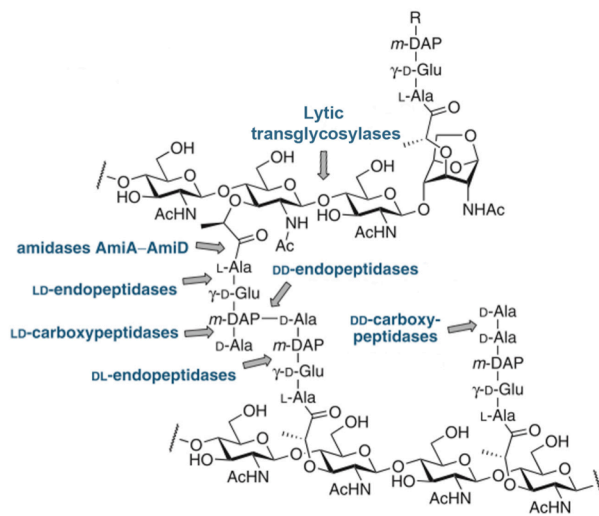


Figura 6: Sitios de corte en el PG de *E.coli* de carboxipeptidasas, endopeptidasas, amidasas y transglycosilasas líticas.

El proceso de reciclaje del PG comienza con la acción de las transglycosilasas líticas (LTs). Situadas en el espacio periplásmico, se encargan de romper el enlace β -(1,4)-glicosídico de las cadenas glicánicas que forman el PG, y únicamente actúan entre los azúcares NAM y NAG. La reacción de ruptura ocurre de una forma muy inusual, ya que no se produce por hidrólisis, sino que el grupo hidroxilo del C₆ del ácido N-acetilmurámico ataca intramolecularmente al C₁ del mismo NAM, formando un biciclo, sin que se produzca pérdida de agua (Figura 7)

(Höltje *et al.*, 1975). El producto final de la actividad de estas LTs (AnhNAM-NAG) es el metabolito N-acetil- β -D-glucosamina-(1,4)-1,6-anhidro-N-acetil- β -D-muramil-L-Ala-D- γ -Glu-meso-DAP-(D-Ala)_n, con n=0, 1, 2, siendo el tetrapéptido (n=1) el producto más frecuente (Vollmer *et al.*, 2008).

Este producto es internalizado al citoplasma a través de la permeasa AmpG, en donde es hidrolizado por la β -N-acetil glucosaminidasa NagZ que rompe el enlace glicosídico entre los azúcares AnhNAM-NAG, para generar NAG y los productos anhidrosacáridos (de tri a pentapéptidos). En circunstancias normales, es decir, en ausencia de inductores β -lactámicos, estos anhidromuropéptidos son hidrolizados por la amidasa AmpD, tal y como muestra la Figura 7. De esta forma y mediante una serie de reacciones sucesivas, todos los productos se convierten de nuevo en el Lípido II, que se transporta desde el citoplasma hasta el periplasma para comenzar de nuevo la síntesis del PG.

El reciclaje de la pared bacteriana en bacterias Gram-negativas está directamente relacionado con la inducción de la β -lactamasa AmpC. La acumulación en el citoplasma de anhidromurotripeptidos sirve como señal para la producción de estas β -lactamasas.

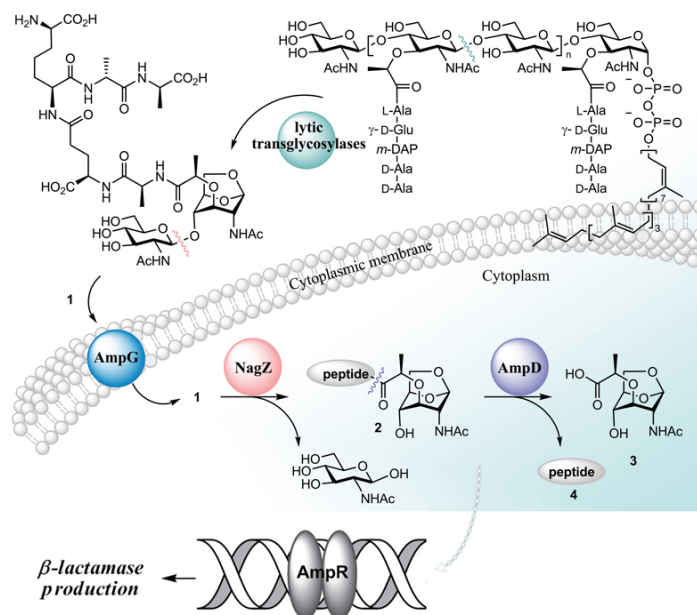


Figura 7: Esquema global de la acción de las enzimas implicadas en el reciclaje del peptidoglicano de organismos Gram-negativos.

1.5. LAS TRANSGLICOSILASAS LÍTICAS

En bacterias Gram-negativas, las transglicosilasas líticas (LTs) son de vital importancia para el reciclaje del peptidoglicano puesto que facilitan su biosíntesis y ruptura. El gran tamaño de varios complejos proteicos insertados en la pared bacteriana (flagelos u otros sistemas de secreción) hace que sea imposible su paso a través de los poros naturales de la membrana (Scheurwater *et al.*, 2008). La intervención de las LTs para romper y remodelar de manera local el PG alrededor de estos sistemas permiten su inserción, así como el transporte de compuestos como ADN o toxinas entre el interior y el exterior de la célula. Asimismo, los procesos de crecimiento y división celular son funciones clave para las LTs (Dijkstra & Keck, 1996).

Los organismos Gram-negativos suelen poseer múltiples LTs responsables de la misma reacción, tal y como muestra la Figura 8. El hecho de que existan varias proteínas que realizan la misma función dentro de una bacteria plantea muchas incógnitas acerca de si sus funciones son distintas y complementarias o, en cambio, redundantes y paralelas. Dada la suma importancia de estas proteínas para el buen funcionamiento celular, la redundancia sería una forma de salvaguardar su funcionamiento (Lee *et al.*, 2013) y por tanto la vida de la bacteria en distintos escenarios. De hecho, la inactivación de las siete LTs en *E. coli* no es tolerada por la bacteria, aunque la pérdida de enzimas individuales no es letal, lo que implica que existe cierta redundancia para funciones celulares críticas como las que desarrollan las transglicosilasas líticas (Heidrich *et al.*, 2002).

INTRODUCCIÓN

Esta redundancia en la producción de LTs es análoga a la situación de las PBPs, responsables de la transpeptidación y transglicosilación del PG en la etapa final de síntesis.

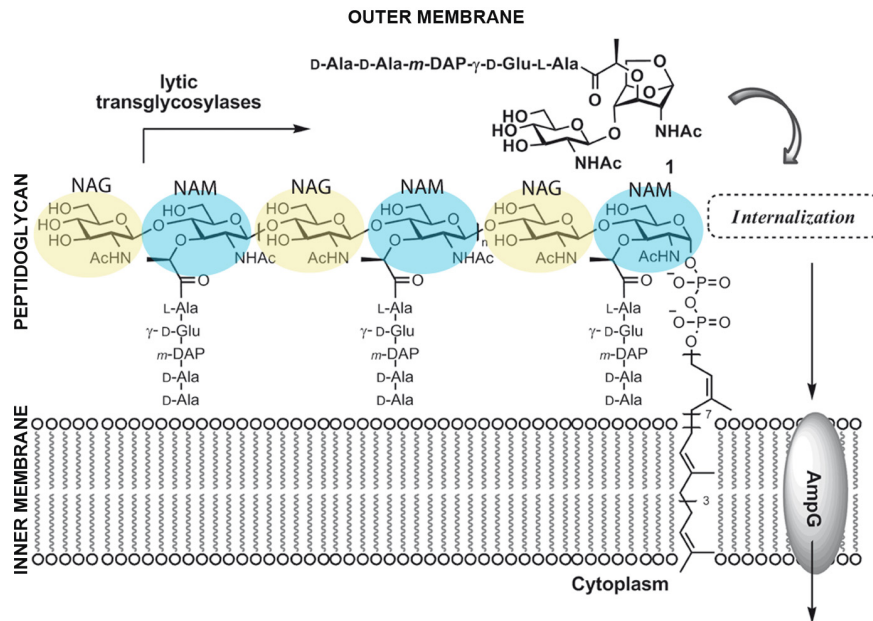


Figura 8: Modo de acción de las LTs en el periplasma, que rompen el enlace entre los azúcares NAG y NAM, formando un producto anhidrodisacárido característico de estas enzimas.

1.6. CLASIFICACIÓN DE LAS TRANSGLICOSILASAS LÍTICAS

Las transglicosilasas líticas se clasifican en cuatro familias, en base a la similitud de secuencias y a la identificación de ciertos motivos consenso (Blackburn & Clarke, 2001). Esta clasificación se hizo alineando en las bases de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) las secuencias de las LTs de *E. coli* y *P. aeruginosa*, y las endolisinas del bacteriófago λ .

Según esta clasificación, las LTs de *E. coli* se dividen en:

- Familia 1: formada a su vez por cinco subfamilias: 1A (Slt70), 1B (MltF), 1C (MltC), 1D (MltD) y 1E (MltE). Todas ellas comparten un mismo dominio catalítico con similitud de secuencia con la lisozima de ganso, y en toda la familia se conserva el residuo catalítico (Figura 9).
- Familia 2: MltA
- Familia 3: MltB
- Familia 4: endolisinas del bacteriófago λ han demostrado tener una función de LT (Taylor & Gorazdowska, 1974).



Figura 9: Alineamiento de las zonas más conservadas del módulo catalítico de las LTs de la Familia 1 de *E. coli*. En rojo, residuos conservados en las cinco proteínas de la misma familia. En violeta 4/5, en naranja 3/5 y en verde 2/5.

Dado que las secuencias de MltA y MltB de *E. coli* no están relacionadas con las de la Familia 1 (Dijkstra *et al.*, 1995; Ehlert *et al.*, 1995) o entre ellas (Blackburn & Clarke, 2001) cada una se ha considerado como representante de una familia distintas (Familias 2 y 3 respectivamente).

En otras bacterias Gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa* existen por lo menos siete LTs, cuatro de las cuales pertenecen a la Familia 3 (MltB, SltB1, SltB2, SltB3). La Familia 1 tiene análogos para la Slt70 (PA3020) y MltD de *E. coli*, pero no posee un gen que codifique para la MltC ni MltE (Blackburn & Clarke, 2002). *Neisseria gonorrhoeae* produce cinco LTs distintas, LtgA-LtgE, homólogas a las correspondientes de *E. coli* (Chan *et al.*, 2012; Malott *et al.*, 2013).

A pesar de la poca información disponible hasta el momento, se han hecho intentos de relacionar las distintas familias de LTs con determinadas funciones celulares. Así, la Familia 1 parece estar involucrada con los sistemas de secreción y conjugación (por ejemplo, VirB de *Agrobacterium tumefaciens* o IpgF de *Shigella flexneri*), la Familia 2 estaría implicada en la septación (como LtgC de *N. gonorrhoeae* o GNA33 de *N. meningitidis*), y la Familia 3 en la formación de flagelos y pili, y en la esporulación (PleA de *Caulobacter crescentus*; BfpH en *E. coli*; SleB de *Bacillus subtilis*). Por último la Familia 4 estaría implicada en la inducción de lisis de los bacteriófagos (Scheurwater *et al.*, 2008).

Las transglicosilasas líticas parecen estar implicadas en patogénesis (Cloud-Hansen *et al.*, 2006), como demuestran varias LTs de distintos patógenos animales y vegetales (*Haemophilus influenza*, *N. meningitidis*, *S. flexneri*, *Erwinia amylovora*, o *Pseudomonas syringae*), cuya actividad es regulada durante la infección. Los productos de reacción de las LTs están directamente implicados en procesos infecciosos. Los fragmentos de peptidoglicano influyen en los síntomas generales de infecciones bacterianas como la fiebre, falta de apetito y somnolencia, simulando a los receptores intracelulares NOD1 y NOD2.

INTRODUCCIÓN

	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	Posibles Implicaciones
Familia 1	Slt70 MltF MltC MltD MltE	PA3020 MltD	Sistemas de secreción y conjugación
Familia 2	MltA	MltA	Septación
Familia 3	MltB	MltB SltB1 SltB2 SltB3	Formación de flagelos y pili
Familia 4	Endolisinas bacteriófago λ	Endolisinas bacteriófago	Inducción de lisis de bacteriófagos

Tabla 1. Clasificación de las LTs de *E. coli* y *P. aeruginosa*. Posibles funciones de las distintas familias.

1.7. INFORMACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS TRANSGLICOSILASAS LÍTICAS DE *ESCHERICHIA COLI*

En *Escherichia coli* existen siete LTs diferentes: Slt70, MltA, MltB, MltC, MltD, MltE, MltF. De todas ellas, sólo una es soluble (Slt70). El resto son lipoproteínas ancladas a membrana a través de una cisteína. Este anclaje lipídico probablemente funcione como mecanismo asociado a la regulación y especificidad de la enzima ante la degradación directa de la pared celular.

Previo a este trabajo, han sido descritas las estructuras tridimensionales de Slt70 (Familia 1A) (van Asselt *et al.*, 1999), MltA (Familia 2) (Van Straaten *et al.*, 2005) y MltB (Familia 3) (van Asselt *et al.*, 1993). Todas ellas difieren en secuencia, tamaño, plegamiento y localización celular, sin embargo, todas comparten el mismo mecanismo catalítico y disponen de un sitio activo en forma de canal para acomodar la cadena glicánica.

Aunque las siete LTs de *E. coli* tienen, en teoría, la misma función, lo cierto es que hay evidencias de que existen diferencias importantes en los mecanismos de acción de estas proteínas. La MltA, por ejemplo, acepta como sustrato cadenas glicánicas sin péptidos (Romeis *et al.*, 1993). La MltB es la única capaz de romper cadenas cortas de PG sintetizadas en el laboratorio (Suvorov *et al.*, 2008). La MltE, objeto de esta Tesis, es la que tiene mayor actividad endolítica (Kraft *et al.*, 1998), ya que es capaz de romper las cadenas glicánicas desde el centro. Esta proteína jugaría, por tanto, un papel fundamental en el proceso de reciclaje del PG, ya que podría ser la encargada de comenzar el proceso de ruptura de las largas cadenas glicánicas.

A continuación se muestra un resumen de la información estructural publicada de las transglicosilasas líticas de *E. coli*.

1.7.1. Slt70

La Slt70 (70KDa, 618 residuos) es una LT perteneciente a la Familia 1A. Se trata de una enzima soluble localizada en el periplasma (Engel *et al.*, 1991). Una supresión del gen *slt* no afecta al crecimiento, la morfología celular o la composición del murepéptido del PG pero sí altera la sensibilidad de *E. coli* frente a varios inductores β -lactámicos (Templin *et al.*, 1992).

Estudios por cromatografía de afinidad indicaron ciertas interacciones proteína-proteína entre la Slt70 y algunas PBPs, en concreto con la PBP2, PBP3 y PBP7/8, lo que puede sugerir una posible participación de la Slt70 en un complejo multienzima (Romeis & Höltje, 1994; von Rechenberg *et al.*, 1996).

La Slt70 es también la primera estructura resuelta por cristalografía de rayos X de una LT (código PDB: 1QSA) (van Asselt *et al.*, 1999). Está formada por tres dominios ricos en α -hélices cuya disposición recuerda a un anillo (Figura 10). El dominio N-terminal contiene 22 α -hélices, y se denomina dominio “U” por su forma. Este dominio “U” se conecta a través de una zona desestructurada de 17 residuos al dominio “L” (residuos 378-450) formado por dos α -hélices cortas y cuatro más largas. El dominio C-terminal, dominio “C”, es el dominio catalítico (residuos 451-618) que empaqueta encima del anillo formado por los dominios “U” y “L”. El dominio “C” es un dominio globular que contiene nueve α -hélices y cuyo plegamiento es parecido al de la lisozima de ganso, a pesar de la baja similitud en secuencia con ella (Thunnissen *et al.*, 1995). El sitio activo se localiza en este dominio, con el Glu478 como residuo catalítico. La mutación de este residuo deja una molécula totalmente inactiva. Según el consenso ya establecido para las lisozimas en el que se definen los sitios de unión a azúcares y siguiendo la analogía de otras glicosilhidrolasas (Davies & Henrissat, 1995; White & Rose, 1997) el sitio activo de Slt70 tiene seis subsitios de unión a azúcares, etiquetados desde -4 hasta +2, produciéndose la transglicosilación intramolecular entre los sitios -1 y +1.

La estructura de Slt70 en complejo con el 1,6-anhidroNAM tripéptido (código PDB: 1QTE)(van Asselt *et al.*, 1999), muestra el sitio de reconocimiento para el péptido, situado entre los tres dominios (Figura 10B).

La estructura de la Slt70 con el inhibidor Bulgecina A (código PDB: 1SLY) (Thunnissen, Rozeboom, *et al.*, 1995), cuya estructura es similar a la unidad disacárida del PG, muestra la unión del inhibidor al sitio activo de la enzima (Figura 10B).

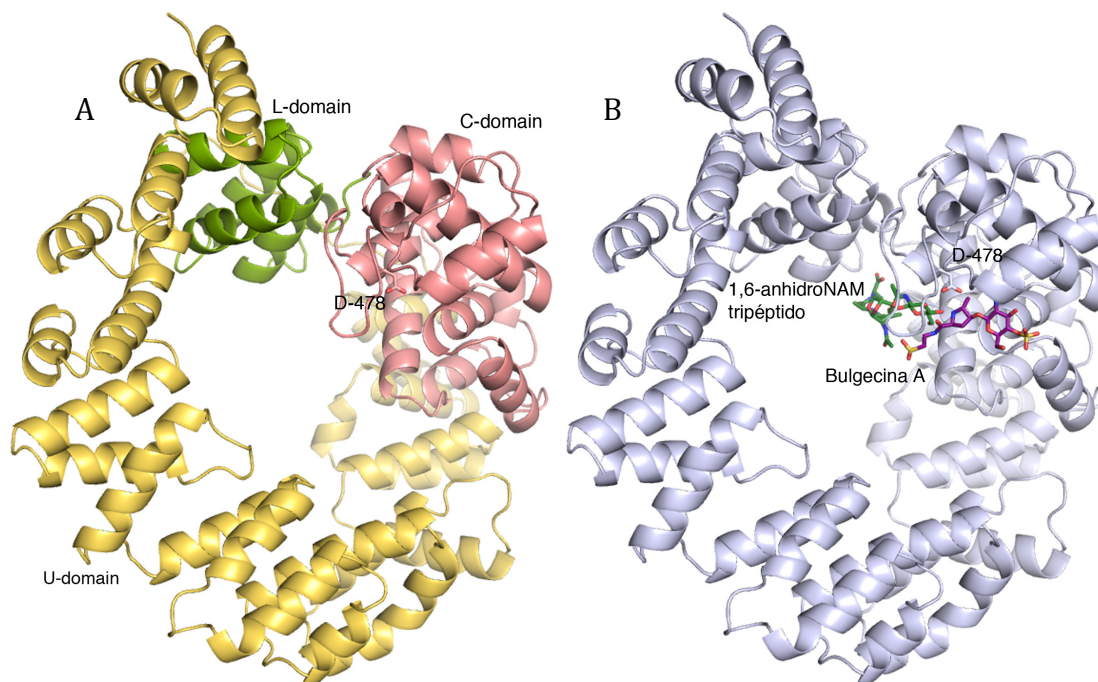


Figura 10: Estructura de Slt70. A) Representación de los distintos módulos de Slt70. En amarillo el dominio “U”, en verde el dominio “L” y en salmón el dominio catalítico “C”. B) Representación de la Slt70 en complejo con 1,6-anhidromurámico tripéptido en verde y Bulgecina A en morado.

1.7.2. MltA

MltA (38KDa, 365 residuos) es una muramidasa anclada a la membrana perteneciente a la Familia 2 de las LTs. Esta enzima difiere de la Slt70 en que acepta como sustratos cadenas de PG sin péptidos (Romes *et al.*, 1993; Ursinus & Höltje, 1994). La supresión del gen *mltA* no afecta al crecimiento y a la morfología celular (Lommatzsch *et al.*, 1997). Ensayos de cromatografía de afinidad revelaron que existen interacciones proteína-proteína de MltA con algunas PBPs y proteínas periplásmicas (Vollmer, 1999). En concreto, la proteína periplásmica MipA actúa como mediadora en la interacción de MltA-PBP1b, lo que sugiere la participación de MltA en un complejo de síntesis del PG.

La estructura cristalográfica de la MltA (código PDB: 2AE0) (Van Straaten *et al.*, 2005) no comparte ninguna región similar en secuencia con ninguna LT. MltA es la más distante de todas las LTs desde el punto de vista estructural. No posee ninguna similitud con el plegamiento de lisozima de ganso y está formada principalmente por β -láminas. Es la única que posee un ácido aspártico (Asp308) en vez de un glutámico como residuo catalítico.

La MltA posee dos dominios ("A" y "B") separados entre sí por un canal. En la parte N-terminal se encuentra el dominio A (residuos 3-104 y 244-337), formado por un barril β con seis β -láminas y dos β -láminas paralelas al inicio y final del barril. El dominio B (residuos 105-243) se inserta entre las láminas β 3 y β 10. Este dominio posee 6 α -hélices, así como un pequeño barril β (β 4-9) más abierto que el del dominio A (Figura 11).

La MltA se ha resuelto también en complejo con el ligando chitohexaosa (código PDB: 2PI8) (Van Straaten *et al.*, 2007). En esa estructura se demuestra que en el sitio activo, como ocurre en la Slt70, también se pueden unir hasta 6 azúcares (-4, -3, -2, -1, +1, +2) (Figura 11).

Las grandes diferencias estructurales entre la MltA y el resto de LTs hacen pensar que el origen de la MltA sea el mismo que el de la endoglucanasa V (EGV) de *Humicola insolens*, una enzima encargada de romper el enlace glicosídico β -1,4 de la celulosa. A pesar de su baja homología de secuencia, ambas enzimas comparten un plegamiento similar y un considerable número de residuos conservados (Van Straaten *et al.*, 2005).

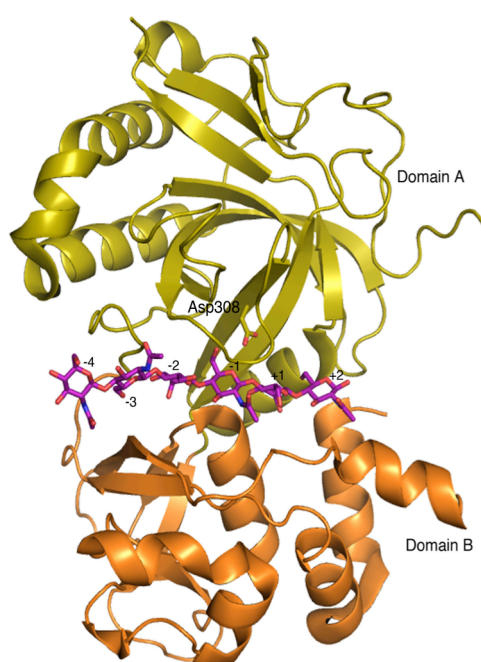


Figura 11: Estructura de la MltA en complejo con chitohexaosa. El dominio A está coloreado en amarillo y el dominio B en naranja. Ligando en morado

1.7.3. MltB

La transglicosilasa lítica MltB (36KDa, 347 residuos), que pertenece a la Familia 3, tiene una especial importancia por encontrarse en dos formas distintas dentro de la célula: una anclada a la membrana (MltB) y la otra en una forma soluble (Slt35) (Engel *et al.*, 1992). Este anclaje lipídico probablemente funcione como medida preventiva ante la degradación directa de la pared celular (Ehlert *et al.*, 1995). La Slt35 se proteoliza de forma natural de la MltB, cortando 39 aminoácidos.

Una supresión del gen *mltB* en *E. coli* no provoca cambios en el crecimiento celular o en la composición del PG, aunque su sobreproducción genera células esféricas y lisis celular (Ehlert *et al.*, 1995).

La estructura de Slt35 (código PDB: 1QUS) (van Asselt *et al.*, 1993) es una molécula elipsoide que consta de tres dominios: el dominio "alfa", el dominio "beta" y el dominio "core", situado entre los dos anteriores (Figura 12). Este último dominio tiene un plegamiento similar al de la lisozima de ganso, pero cuenta además con un sitio de unión a calcio cuyo plegamiento es parecido a una mano E-F (hélice-loop-

hélice). Los dominios “alfa” y “core” forman el sitio catalítico, en donde se introduce la cadena glicánica. El sitio activo de Slt35 es más corto que el de otras LTs, presentando únicamente cuatro sitios de unión a azúcares (-1, -2, +1, +2) y dos sitios de unión a péptidos (van Asselt *et al.*, 2000).

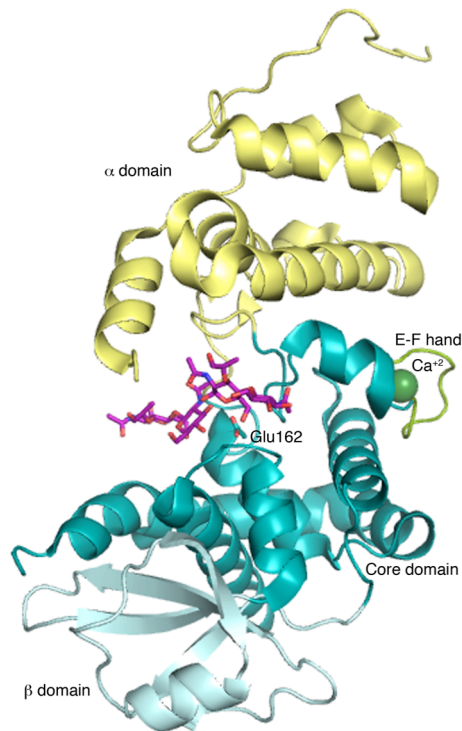


Figura 12: Estructura de la MltB en complejo con dos fragmentos NAG-NAM. Los distintos dominios que componen la estructura están coloreados en distintos colores: el dominio α amarillo, β en azul claro y core en azul oscuro. El ligando representado en morado.

A pesar de carecer de cualquier similitud en cuanto a secuencia, las estructuras del dominio “core” y del dominio catalítico de Slt70 son parecidas entre sí y parecidas a la de la lisozima de ganso. El residuo Glu162 actúa como ácido-base en el proceso de ruptura del enlace glicosídico. La mutación de este residuo deja una molécula totalmente inactiva.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, MltB posee una mano E-F de unión a Ca^{+2} , aunque la coordinación y el número de residuos no son exactamente iguales que los descritos para una mano E-F clásica. Su función dentro de la proteína no se conoce exactamente. El sitio del Ca^{+2} se encuentra a unos 20 Å del sitio activo, por lo que se descarta una implicación directa en la actividad catalítica de la enzima (van Asselt *et al.*, 1999), sin embargo, la unión a calcio podría ayudar al plegamiento de la proteína en el periplasma así

como a la interacción de la MltB con otras proteínas, como las PBPs (von Rechenberg *et al.*, 1996).

Entre los residuos 99-108 se encuentra una zona desestructurada que impide el acoplamiento de cadenas largas de PG, lo que podría estar restringiendo la actividad de la MltB a cadenas de PG simples, e imponiendo una actividad exolítica a la enzima (van Asselt *et al.*, 1999).

Por otra parte, y a pesar de que ensayos de zimografía han detectado actividad catalítica para todas las LTs, solamente MltB es capaz de procesar una cadena sintética corta de PG (Suvorov *et al.*, 2008).

1.8. MECANISMO DE LAS TRANSGLICOSILASAS LÍTICAS

El análisis detallado de las estructuras de la Slt70, MltA, MltB y MltE ha demostrado que, a pesar de las diferencias estructurales y de secuencia, todas las LTs comparten el mismo mecanismo catalítico. Aunque las lisozimas también rompen el enlace β -(1,4)-glicosídico, es el mecanismo de reacción lo que diferencia estas enzimas. Las lisozimas tienen un mecanismo hidrolítico mientras que las LTs no son hidrolasas sino que realizan una transglucosilación intramolecular, formando un bicyclo no reductor, característico de las mismas, como producto de reacción.

El mecanismo de acción de todas las LTs se lleva a cabo en tres pasos (Figura 13) (Thunnissen, Rozeboom *et al.*, 1995; van Heijenoort, 2011). Se trata de un mecanismo ácido-base, en el que el Glu/Asp se protona y actúa como ácido en el primer paso de la reacción y como base en el segundo paso de la reacción. Inicialmente, el ácido glutámico catalítico (en MltA es un aspártico) actúa como ácido, donando un protón al oxígeno del enlace glicosídico, y rompe el enlace entre el NAM-NAG, en las posiciones -1 y +1 del sitio activo de la proteína. Este paso genera un intermedio oxocarbonión protonado que se estabiliza por medio del grupo N-aceto del residuo murámico. El Glu/Asp ahora desprotonado actúa como base, y arranca un protón al grupo hidroxilo del C₆ del NAM. El oxígeno con carga negativa actúa como nucleófilo y ataca intramolecularmente al carbono anomérico positivo (el C₁), formando así el producto de reacción 1,6-anhidromurámico característico de las LTs. Este proceso está acompañado por un gran cambio conformacional en el murámico, cuyos sustituyentes pasan de la posición ecuatorial a la axial tras la reacción (Suvorov, Fisher *et al.*, 2008).

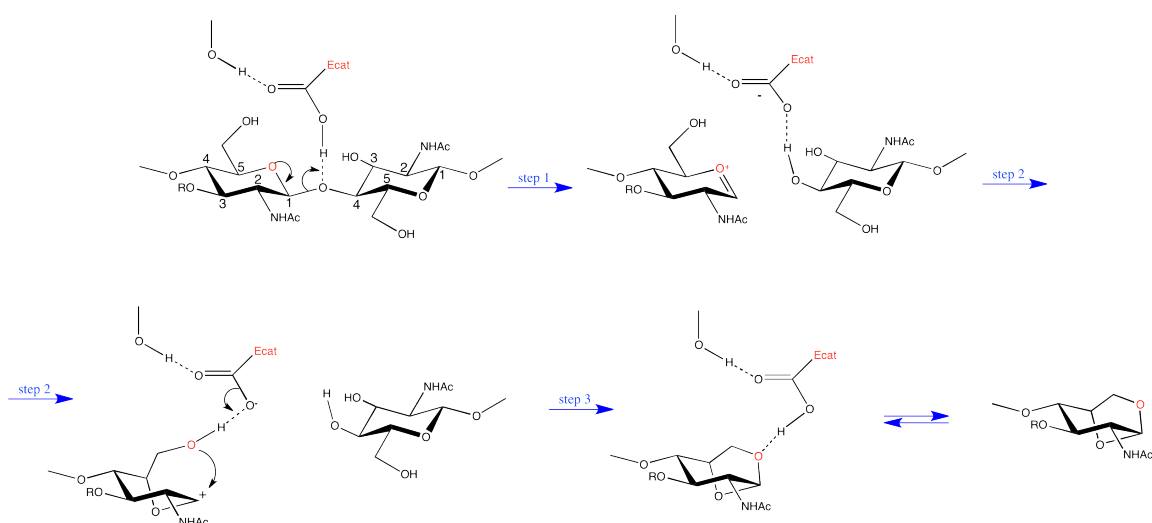


Figura 13: Mecanismo de reacción de las LTs. Paso 1: ruptura de enlace glicosídico NAM-NAG y formación del ion oxocarbonio como intermedio de reacción. Paso 2: ataque nucleofílico intramolecular sobre el C₁. Paso 3: extracción de un protón por el residuo catalítico y formación del 1,6-anhidroNAM-péptido.

1.9. CONTROL DE LA ACTIVIDAD AUTOLÍTICA

Las LTs son autolisinas degradadoras de PG. El descontrol de su actividad autolítica causarían la total destrucción de la pared celular, por lo que es necesaria una regulación de su actividad *in vivo*. Sin embargo, los detalles de esta regulación no se conocen con detalle todavía.

Uno de los mecanismos más comunes de regulación de la actividad de una enzima es la orto-acetilación del PG, de tal forma que la modificación del sustrato impediría la formación del producto final: el 1,6-anhidroNAM. Las modificaciones del PG tienen un doble efecto: bloquean la acción hidrolítica de las lisozimas y regulan la actividad de las LTs (Moynihan & Clarke, 2011). Tal y como muestra la Figura 14, las O-acetiltransferasas (PATs) se encargan de acetilar el grupo hidroxilo del C₆ del NAM, mientras que las O-acetilesterasas (APEs) eliminan este grupo acetil (Johnson *et al*, 2013).

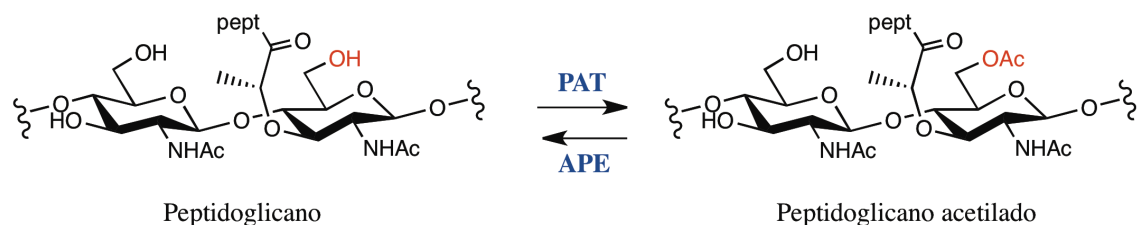


Figura 14. Mecanismos de acetilación y desacetilación del PG para controlar la actividad autolítica de las LTs.

Otras formas de regular la actividad de estas enzimas es mediante su asociación y separación con otras proteínas, como las PBPs (Höltje, 1996). Por ejemplo, se sabe que *E. coli* y *P. aeruginosa* tienen la mayoría de sus LTs ancladas a la zona interna de la membrana externa, situándolas en el periplasma (Höltje, 1998). Tanto las lipoproteínas ancladas a la membrana como sus formas solubles parecen formar complejos con otras proteínas periplásmicas, las PBPs, situadas en la parte externa de la membrana citosólica (Koraimann, 2003). La situación estratégica de ambas proteínas permitiría que estos complejos proteicos sirviesen para mantener unidas las dos membranas que encierran el PG. Este complejo LT-PBP también controlaría la actividad autolítica de la LT ya que entraría en conflicto con la capacidad de transglicosilación de la PBP, de tal forma que ambas actividades, ruptura y formación de enlaces glicosídicos, tendrían que llegar a un acuerdo en función de que la célula crease nuevos espacios para insertar material o regenerase su PG para crecer (Scheurwater *et al.*, 2008). Igualmente, las LTs son capaces de asociarse con otros complejos proteicos implicados en el sistema de secreción (Höppner *et al.*, 2005). Para esto, una actividad lítica pequeña sería suficiente para impedir por completo la expulsión del sistema de secreción de proteínas a través del PG. La asociación de las LTs con el aparato de secreción permitiría la coordinación apropiada de las mismas, impidiendo la autólisis.

1.10. PRODUCTOS DE REACCIÓN DE LAS TRANSGLICOSILASAS LÍTICAS

El análisis de los productos de reacción de todas las LTs de *E. coli* ha sido recientemente publicado por el grupo del Dr. Shahriar Mobashery en la Universidad de Notre Dame (EEUU) (Lee *et al.*, 2013).

En este estudio se determinan cuáles son los productos de cada LT frente al sáculo de *E. coli* y se comparan los distintos productos de reacción de cada LT. La dificultad de este experimento es enorme ya que el sáculo es un polímero muy complejo y la caracterización e identificación de los productos de reacción de cada enzima requiere métodos de medida extremadamente sensibles.

Para realizar estos experimentos se utilizó sáculo purificado como sustrato para cada una de las siete LTs, empleando como técnicas de detección la cromatografía líquida y la espectrometría de masas (LC/MS). Se trata un procedimiento que combina las propiedades físicas de separación de la cromatografía de líquidos (HPLC) con el análisis de masas de la espectrometría de masas. Es una combinación muy sensible y selectiva para identificar cada uno de los compuestos químicos de una mezcla. Con este estudio se pretende detectar la cantidad producida de cada uno de los productos de reacción procedentes de cada LT con una sensibilidad de pocos picomoles.

Para ello se preparó sáculo de *E. coli* en su fase estacionaria y exponencial y se expusieron de forma individual a todas las LTs. El resultado obtenido se caracterizó por LC/MS utilizando un analizador de masas con un alto poder de resolución (>10000) que permitió la determinación de iones de alto peso molecular (>2000 Da). De esta forma es posible una comparación directa de todos los productos de reacción. En todas las reacciones se utilizaron cantidades constantes de enzima. Los productos minoritarios que no se pudieron ver por radiación ultravioleta (UV) a 205nm se detectaron por espectroscopía de masas (MS). Se encontraron hasta 18 productos minoritarios distintos pero el 96% del total fueron productos mayoritarios.

A continuación se presenta una tabla con la cantidad de productos de reacción mayoritarios de cada LT de *E. coli* en la fase estacionaria del sáculo y su abundancia relativa (Tabla 2). Las cantidades están expresadas como porcentaje del área del pico del cromatograma (EIC-Extracted-ion Chromatogram).

INTRODUCCIÓN

	MltA	MltB	MltC	MltD	MltE	MltF	Slt70
Actividad relativa ^a	1.0	0.3	0.1	0.006	0.009	0.001	0.01
Prod. no entrecruzados	56	59	72	65	53	62	57
Prod. entrecruzados	40	29	23	0	3	0	5
Prod. Hidrolizados ^b	0	1	1	28	10	38	17
Actividad endolítica	0	7	0.5	7	33	0	20
Prod. minoritarios	4	4	4	0	4	0	1
Total	95%	94%	96%	97%	96%	99%	92%

Tabla 2. ^a Áreas de los picos que miden la cantidad de muropéptidos para cada una de las enzimas y normalizadas frente a la MltA. ^b Productos sin anhidroNAM.

De los resultados se puede concluir que todas las LTs producen NAG-1,6-anhidroNAM-tetrapéptido. Además, algunas LTs discriminan el sustrato dependiendo de la presencia o ausencia de enlaces entrecruzados. No se detectan ningún producto con enlaces cruzados para MltD ni MltF, mientras que MltE y Slt70 generan menos de un 5% de estos productos. MltA es la encima más activa, seguida por MltB, MltC, Slt70, MltE, MltD y MltF, basándose en el total de muropéptidos encontrados para cada enzima.

También se identificaron productos de reacción con un extremo reductor, es decir, sin el extremo anhidromurámico. En general, las cantidades para este tipo de productos son pequeñas, pero cabe destacar que enzimas con una actividad relativa escasa producen más cantidad de este tipo de productos. Esta reacción se podría explicar asumiendo que MltD, MltF y Slt70 podrían tener algo de actividad muramidasa, como se ha visto ya en algunas LTs de *Bacillus subtilis* (Sudiarta *et al.*, 2010).

Este estudio también ha demostrado la actividad endolítica de MltE. Esta proteína es la que produce mayor cantidad de productos endolíticos, aunque también se ha observado algo actividad endolítica en enzimas consideradas exclusivamente exolíticas como MltB, MltD y Slt70. La MltC, también objeto de estudio de esta Tesis, produce un 0.5% de producto endolítico. En otras enzimas como MltA y MltF no se observó ningún producto endolítico.

No se obtuvieron resultados distintos entre la fase estacionaria y de crecimiento de la bacteria, pero la cantidad de producto es hasta tres veces mayor en el caso de la fase de crecimiento.

Este estudio demuestra que, a pesar de la redundancia de las LTs, existen claras diferencias entre ellas según su preferencia para elegir sustratos con enlaces entrecruzados o sin ellos, o su habilidad para llevar a cabo reacciones endolíticas.

1.11. LAS TRANSGLICOSILASAS LÍTICAS COMO DIANAS TERAPÉUTICAS

Las bacterias son sensibles a cualquier perturbación que ocurra en su pared celular, desarrollando mecanismos propios de defensa. En este sentido, las transglucosilasas líticas aparecen como una diana terapéutica especialmente prometedora (Scheurwater *et al.*, 2008), puesto que se trata de enzimas encargadas de realizar funciones críticas para el buen funcionamiento celular que actúan sobre una estructura única en la bacteria.

Los antibióticos que se usan actualmente para combatir infecciones bacterianas (como β -lactamas y vancomicina) van dirigidos a la malformación de la malla del PG, inhabilitando los enlaces entre las partes peptídicas de las cadenas, en donde pueden existir variaciones entre los distintos patógenos. Sin embargo, las LTs tienen como sustrato una zona única e invariable del PG, lo que da evidencias de un lento desarrollo de resistencias frente a estos inhibidores. Una inhibición total de las LTs con un antibiótico de amplio espectro abriría nuevas oportunidades para el desarrollo de nuevos fármacos. El diseño de nuevos inhibidores de alta afinidad por el sitio activo de estas enzimas podrían ser útiles en la constante lucha contra patógenos infecciosos.

1.12. INDUCCIÓN DE β -LACTAMASAS Y RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS

Las β -lactamasas son las enzimas encargadas de combatir los antibióticos β -lactámicos atacando e hidrolizando el anillo β -lactámico (Figura 15). El proceso de reciclaje de PG se encarga de regular la inducción de β -lactamasas utilizando muchas de las proteínas implicadas en este proceso.

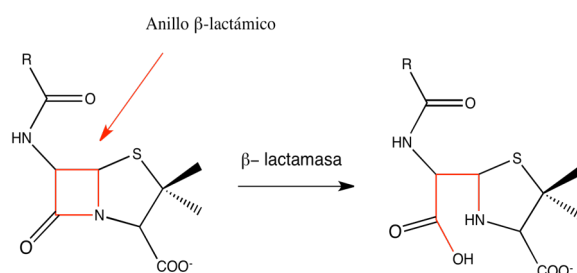


Figura 15. Ataque de las β -lactamasas a los antibióticos β -lactámicos.

En patógenos Gram-negativos, la proteína AmpC- β -lactamasa se encuentra de forma normal en la bacteria a niveles basales muy bajos. La presencia de inhibidores β -lactámicos induce la producción de niveles elevados de AmpC- β -lactamasas, regulada por la cantidad de muropéptidos acumulados en el citoplasma (Livermore *et al.*, 1995).

El proceso de reciclaje de PG está directamente ligado a la resistencia a antibióticos. Por tanto, el diseño de fármacos dirigidos a enzimas claves en este proceso inhiben este ciclo fundamental para la bacteria y ayudan a vencer las resistencias.

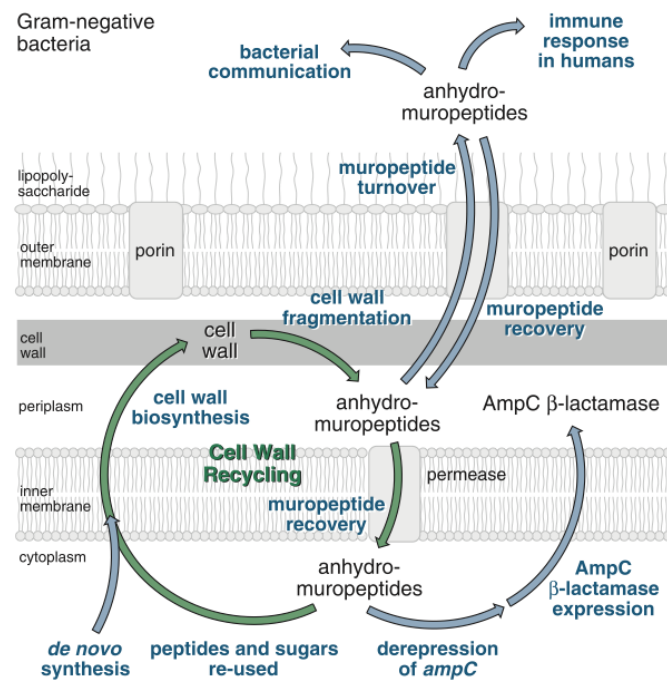


Figura 16: Relación entre el proceso de reciclaje de peptidoglicano y la inducción de β-lactamasas (Johnson *et al.*, 2013).

El gen productor de AmpC es *ampC*, cuya transcripción está controlada por el gen regulador *ampR* (Lindberg *et al.*, 1985). La proteína AmpR posee a su vez una función doblemente reguladora. Por una parte, es capaz de reprimir su propio gen *ampR* y por otra, en presencia de inductores β-lactámicos, activa el gen *ampC* que produce AmpC-β-lactamasas (Lindquist *et al.*, 1989).

Después de la acción de las transglucosilasas líticas, los productos son internalizados al citoplasma, en donde actúa la glicosilhidrolasa NagZ. Posteriormente, AmpD corta el enlace amida entre el grupo lactilo del 1,6-anhidro-N-acetilmurámico y el grupo α-amino de la L-Ala de los tripéptidos y tetrapéptidos (Goodell, 1985; Park, 1993). Su alta especificidad por péptidos que contienen azúcares del tipo 1,6-anhidro-NAM hace que no degrade precursores citosólicos implicados en la síntesis del PG como el UDP-NAM-pentapéptido (Jacobs *et al.*, 1995; Vollmer *et al.*, 2008). De esta forma, AmpD no interfiere en la biosíntesis sino que se encarga de la regulación de las concentraciones de muropeptidos dirigidos al reciclaje.

Los productos citosólicos UDP-NAM-pentapéptido y AnhNAM-tripéptido (sustrato de AmpD) tienen un papel regulador crucial en la inducción de β-lactamasas (Jacobs *et al.*, 1997). Por una parte, el UDP-NAM-pentapéptido es un precursor de PG capaz de unirse a la proteína reguladora AmpR, inactivando la acción de ésta sobre el gen *ampC*. Concentraciones elevadas de UDP-NAM-pentapéptido reprimen la activación del gen *ampC* por AmpR.

Por el contrario, el producto reciclado AnhNAM-tripéptido, que procede de la acción de NagZ, actúa como señal para la inducción de β -lactamasas. La amidasa AmpD, actúa como regulador negativo de la expresión de AmpC- β -lactamasas ya que previene la acumulación de estos anhidromurotripéptidos (Jacobs *et al.*, 1997). Se ha demostrado previamente que al aumentar estos productos (por inactivación o sobresaturación de AmpD), decrecen los niveles celulares de precursor UDP-NAM-pentapéptido (Jacobs *et al.*, 1995) generando una competición entre ambos que regula al gen productor de β -lactamasas *ampC*.

En un crecimiento normal de la bacteria, en ausencia de inductores β -lactámicos, la proteína reguladora AmpR se mantiene en estado inactivo por la unión del ligando UDP-NAM-pentapéptido, de manera que AmpR actúa como represor de su propio gen *ampR*.

La presencia de inductores β -lactámicos durante el crecimiento bacteriano produce una ruptura incontrolada del PG. El exceso de productos internalizados en el citosol satura la actividad de AmpD, lo que resulta en la acumulación de AnhNAM-tripéptido, que desplaza al precursor UDP-NAM-pentapéptido del sitio de unión a AmpR, reactivando la función nativa de la misma. De esta forma, AmpR activa el gen *ampC* y la expresión de AmpC- β -lactamasas, que al ser externalizadas combaten los inductores β -lactámicos (Figura 17). Asimismo, la inactivación de AmpD, incluso en ausencia de inductores β -lactámicos, desencadena una producción elevada de AmpC (Lindberg *et al.*, 1987; Normark, 1995).

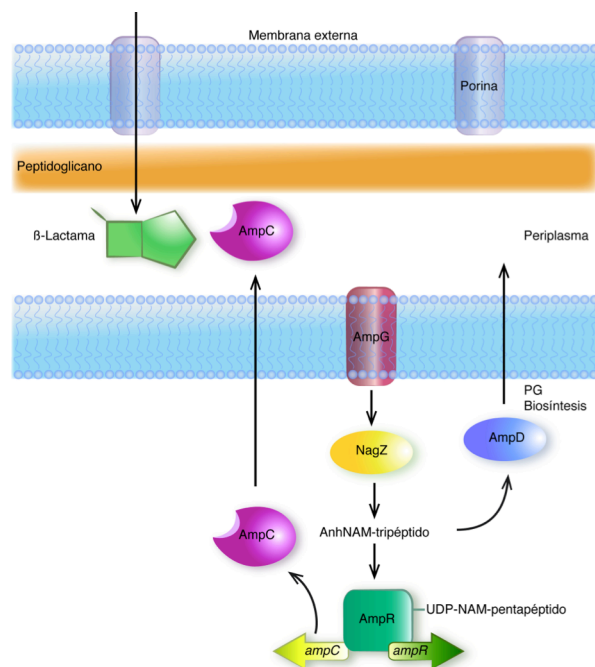


Figura 17: Mecanismo de regulación de AmpR y producción de β -lactamasas.

Este mecanismo de resistencia a antibióticos general para organismos Gram-negativos no se cumple en *Pseudomonas aeruginosa*.

1.13. AMPDs DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Pseudomonas aeruginosa es una de las bacterias Gram-negativas más preocupantes por su alta capacidad infectiva y su resistencia a múltiples antibióticos. Es causante de más de 6700 infecciones distintas que afectan al tracto pulmonar (causando neumonías) y al tracto urinario, así como a tejidos y heridas. Según el CDC (Center for Disease Control and Prevention) sólo en EEUU infecta a unos 51.000 pacientes

cada año. Todas sus infecciones se tratan actualmente con derivados β -lactámicos o cefalosporinas, pero todos ellos son inductores débiles de β -lactamasas, por lo que la aparición de nuevas cepas resistentes es constante. Aquellos mutantes de *Pseudomonas* que producen niveles altos de AmpC son los seleccionados genéticamente, lo que conlleva una derrota en la terapia microbiana actual contra *P. aeruginosa* (Moya *et al.*, 2008).

Al contrario de lo que ocurre con otros organismos patógenos como *Enterobacteriaceae*, en el que la inactivación de AmpD activa totalmente el gen *ampC*, en el patógeno *P. aeruginosa* la regulación de este gen no depende únicamente de AmpD.

Aunque AmpD es una proteína clave en la resistencia a antibióticos por estar directamente implicada en la producción de la β -lactamasa AmpC, en *P. aeruginosa* la represión de *ampD* mantiene unos niveles basales de AmpC (Langae *et al.*, 2000). Estudios posteriores revelaron que esta diferencia respecto al resto de organismos Gram-negativos se produce porque *P. aeruginosa* posee dos genes *ampD* adicionales, llamados *ampDh2* y *ampDh3* (Juan *et al.*, 2006). La inactivación secuencial de los tres genes sí que produce una producción elevada de β -lactamasas, llegando a la total activación de *ampC*.

Recientemente ha sido publicada en nuestro grupo la estructura de AmpD de *Citrobacter freundii* (Carrasco-López *et al.*, 2011) que comparte cerca de un 90% de identidad con la AmpD de *E. coli* y un 60% con la de *P. aeruginosa*. La actividad de esta amidasa depende específicamente del catión Zn^{+2} . La adición de moléculas quelantes como el EDTA inhiben por completo la actividad de la enzima, mientras que la restitución del ión metálico la restablece. Asimismo, la sustitución del zinc por otros iones divalentes como Cu^{+2} , Co^{+2} , Ni^{+2} , Cd^{+2} o Mn^{+2} tampoco activa la proteína (Généreux *et al.*, 2004).

Dada la importancia del patógeno *Pseudomonas aeruginosa*, en este trabajo se ha abordado el estudio de las PG amidasas AmpDh2 y AmpDh3, directamente implicadas en el proceso de reciclaje del PG.

Los tres genes parálogos de *P. aeruginosa* para la proteasa AmpD se diferencian entre sí en que AmpD se encuentra en el citoplasma (igual que en el resto de organismos Gram-negativos), mientras que AmpDh2 y AmpDh3 son amidasas periplásmicas. AmpDh2 posee un péptido señal de lipoproteínas enganchadas a la membrana externa, lo que sugiere que esta proteína podría ser la homóloga de AmiD de *E. coli* (Moya *et al.*, 2008). Por tanto, AmpDh3 parece ser la amidasa “extra” de *P. aeruginosa*. De hecho, AmpDh3 contribuye en mucha mayor medida que AmpDh2 a la represión de *ampC* en el mutante de *ampD*, jugando un papel decisivo en la virulencia de *P. aeruginosa* (Juan *et al.*, 2006).

La multiplicidad de estas amidasas en *P. aeruginosa* se ha demostrado fundamental para combinar la adquisición de resistencia a antibióticos con el mantenimiento de la competitividad biológica y la virulencia. Debido a la presencia de AmpDh2 y AmpDh3, la represión parcial del gen *ampC* mediante la inactivación de *ampD* confiere a *P. aeruginosa* un mecanismo de resistencia biológicamente más eficiente

(Moya *et al.*, 2008). La inhibición de AmpD pero no de AmpDh2 y AmpDh3 no afecta a la eficacia biológica (*fitness*) o la virulencia de la bacteria. Sin embargo la pérdida de la actividad adicional de AmpDh2 o AmpDh3 es crítica para ambos efectos, lo que da importantes indicios sobre la importancia de estas enzimas en *Pseudomonas aeruginosa* (Juan *et al.*, 2006). A pesar de toda esta información, aún son necesarios más estudios que expliquen el papel de cada enzima AmpD, AmpDh2 y AmpDh3 en la regulación de AmpC- β -lactamasas en *P. aeruginosa*, así como sus funciones individuales.

1.14. PRODUCTOS DE REACCIÓN DE LAS AMPDs DE *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

El estudio inicial de la actividad de estas tres enzimas fue realizado por el grupo del Dr. Shahriar Mobashery, en la Universidad de Notre Dame (Zhang *et al.*, 2013).

Para ello se utilizaron sustratos derivados del 1,6-anhidromurámico y del murámico, variando la longitud del péptido (tri, tetra, y pentapéptido), pero intentando imitar las construcciones de la pared celular. Los productos más comunes disponibles en la pared celular son los tri y tetrapéptidos. Los pentapéptidos, utilizados en la síntesis de PG suelen perder el residuo C-terminal D-Ala, por lo que se encuentra en menor medida.

Con las tres enzimas y los seis compuestos previamente sintetizados se realizaron análisis de HPLC para realizar estudios cinéticos. La cinética se monitorizó de forma cuantitativa según la reacción con el sustrato y la formación de productos. Estos productos fueron analizados de forma individual por espectrometría de masas (MS). Tal y como se esperaba, la AmpD reaccionó únicamente con el sustrato anhidro, para dar como productos de reacción el anillo biciclo y el péptido por separado, hidrolizando el enlace amida situado después del grupo lactilo del NAM (Figura 18).

Este mismo estudio se llevó a cabo para las enzimas AmpDh2 y AmpDh3, también con todos los sustratos sintetizados. Para estas proteínas, la hidrólisis del enlace amida se produce en todos los casos. Sin embargo, la actividad correspondiente a los sustratos anhidro representó como mucho un 12% de su actividad total (Figura 18).

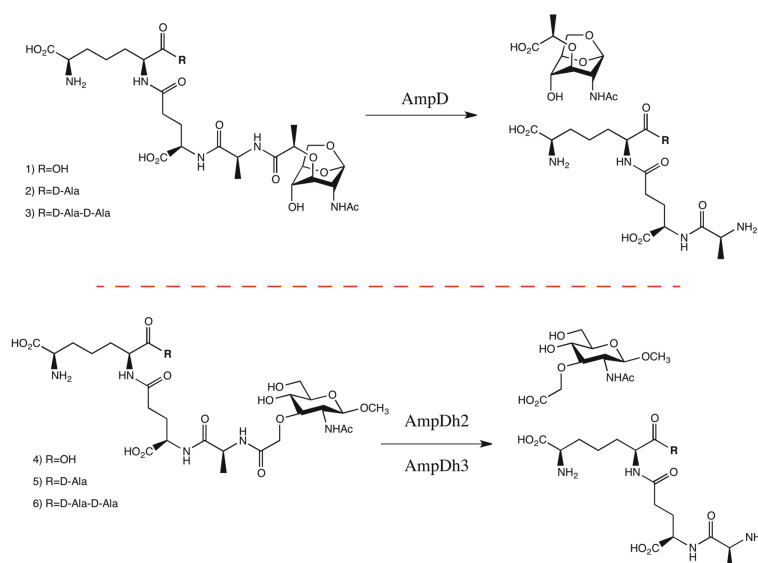


Figura 18: Diferencia entre las reacciones de AmpD, AmpDh2 y AmpDh3.

Por tanto, se ha podido concluir que las amidasas AmpDh2 y AmpDh3, por su distinta localización celular, se han desarrollado y evolucionado para actuar directamente sobre el PG siendo mucho menor su afinidad por los productos procedentes de las LTs. De esta forma, las enzimas AmpDh2 y AmpDh3 reaccionarían en el periplasma degradando el PG, antes (o al mismo tiempo) de que las LTs internalicen sus productos para que reaccionen con NagZ y AmpD en el citoplasma.

Aunque no se conoce el mecanismo de cómo contribuyen estas enzimas a la virulencia, es probable que los productos de ambas estén directamente implicados. Por ello, conocer el mecanismo de actuación de estas enzimas en la bacteria es un primer paso para conocer cómo infecta *P. aeruginosa*.

El proceso de producción de β -lactamasas demuestra que está íntimamente relacionado con todo el mecanismo de reciclaje y modelado de la pared celular (Johnson *et al.*, 2013). Por ello, el estudio de proteínas como las LTs o las AmpDh2 y AmpDh3 en el caso de *P. aeruginosa*, que se encargan de romper los enlaces de PG y de cuyos productos dependen directamente los inductores de β -lactamasas, es esencial para comprender el mecanismo de virulencia de estos patógenos.

TÉCNICAS CRISTALOGRÁFICAS

2. TÉCNICAS CRISTALOGRÁFICAS.

La Cristalografía de rayos X es una de las técnicas experimentales más potentes para determinar la estructura tridimensional de macromoléculas biológicas a nivel atómico y sin límite en la complejidad molecular. Los resultados que proporciona esta disciplina, tales como ángulos y distancias de enlace, estados de orden y/o vibración de los átomos, así como el modo mediante el cual las moléculas se empaquetan para formar el cristal, son clave para desvelar numerosas incógnitas sobre la función biológica de las proteínas.

La determinación de la estructura tridimensional de una macromolécula biológica requiere de la consecución de diferentes etapas concretas que se muestran en el siguiente esquema:

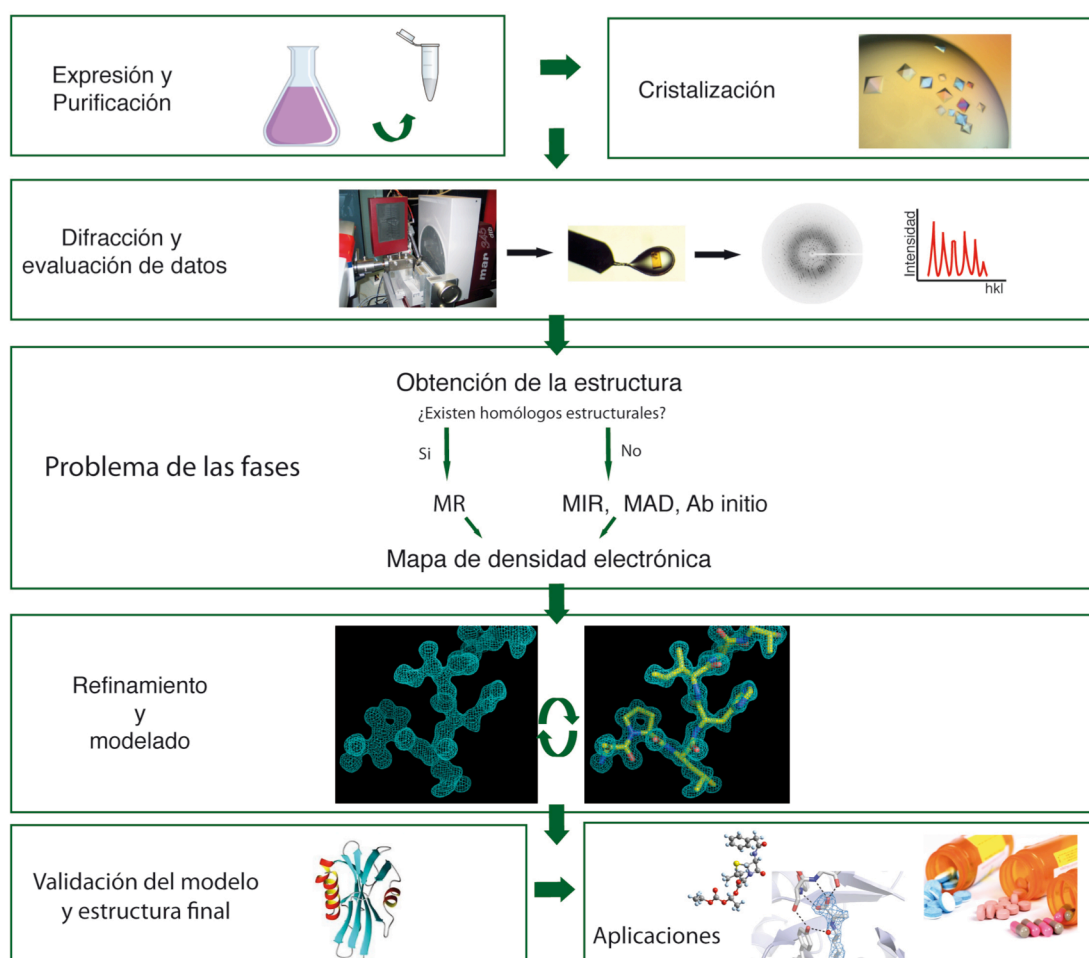


Figura 19. Etapas de la resolución estructural de proteínas mediante Cristalografía de rayos X.

2.1. CRISTALIZACIÓN

Independientemente de la dificultad que pueda representar la obtención de una muestra pura y homogénea de la macromolécula en solución, una de las etapas imprescindibles del proceso es la cristalización, es decir, conseguir que las moléculas en cuestión se ordenen formando un cristal único. En el caso de las proteínas, este paso suele ser complejo ya que las macromoléculas pueden contener zonas móviles, difíciles de estabilizar o incluso, que el orden alcanzado no sea suficiente para dar lugar a un patrón de difracción de calidad suficiente. Los cristales de proteína contienen grandes cantidades de solvente (entre 30 y 80% del volumen del cristal; Matthews, 1968), lo que les confiere una extrema fragilidad y, en general, proporcionan un patrón de difracción débil. Sin embargo, el hecho de encontrar la proteína rodeada de solvente permite obtener su estructura en un ambiente no muy diferente al de su estado fisiológico.

En cualquier caso, el objetivo de la cristalización es obtener cristales de tamaño y orden interno adecuados que proporcionen un espectro de difracción suficientemente completo como para determinar la estructura de las moléculas que lo componen.

2.1.1. CRISTALES Y SIMETRÍA

Se entiende por cristal una red imaginaria formada por una unidad primaria de volumen, denominada *celdilla unidad* (o celdilla elemental) que se repite periódicamente por traslación a lo largo de las tres direcciones del espacio. La celdilla unidad, que se define mediante seis parámetros, tres ejes (a , b , c) y tres ángulos interaxiales (α , β , γ), sirve como sistema de coordenadas para referir las posiciones de cada átomo de la estructura.

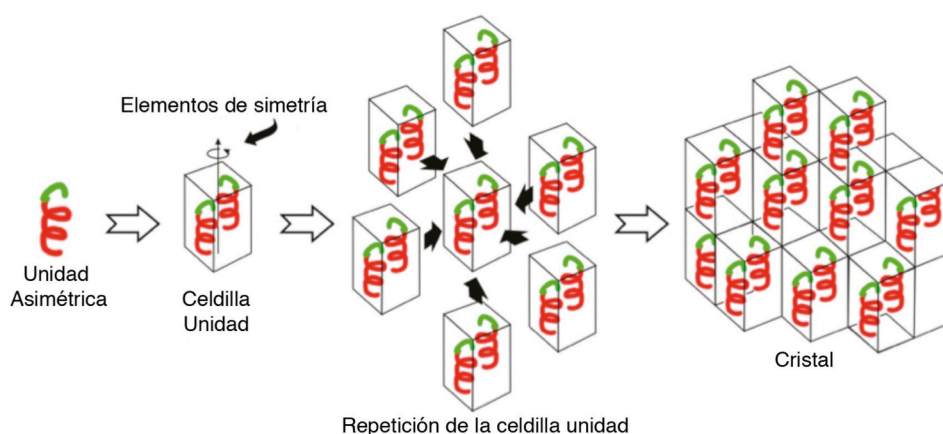


Figura 20. Concepto de unidad asimétrica, celdilla unidad y cristal. La unidad asimétrica se repite dentro de la celdilla unidad, aplicando los elementos de simetría. A su vez, la celdilla unidad se repite, por traslaciones, formando el cristal tridimensional.

Además de las repeticiones por traslación axial que definen la red cristalina, en el interior de la celdilla elemental pueden existir, a su vez, operaciones de repetición que se denominan *elementos de simetría*. Como consecuencia de ello, se conoce como *unidad asimétrica* al conjunto de moléculas que, tras aplicación de los elementos de simetría, rellenan el interior de la celdilla unidad (Figura 20).

El conjunto de operaciones de simetría compatibles con las repeticiones por traslación (retículo cristalino) está limitado a 32 combinaciones diferentes, denominadas *clases cristalinas*, o grupos puntuales cristalinos. Pero a su vez, el número de retículos cristalinos diferentes, compatibles con estas combinaciones no es infinito, sino que está limitado a 14, conocidos con el nombre de *redes de Bravais*.

La combinación de los distintos tipos de retículos posibles (14 *redes de Bravais*) y de los conjuntos de elementos de simetría compatibles (32 *clases cristalinas*) conduce a 230 modos de repetición diferentes mediante los cuales los átomos y las moléculas se empaquetan en el espacio cristalino. De estas 230 modalidades de repetición, que se denominan *grupos espaciales*, las macromoléculas biológicas sólo son compatibles con 65 de ellos. Esta reducción es debida a la quiralidad intrínseca de estas moléculas, por lo que las combinaciones de elementos de simetría de los cristales de estas moléculas no pueden contener centros de inversión. Todos los aspectos de simetría de los cristales, incluyendo los *grupos espaciales*, se encuentran recogidos en las denominadas *Tablas Internacionales de Cristalografía*.

2.1.2. FACTORES QUE AFECTAN A LA CRISTALIZACIÓN

Los cristales de proteína crecen debido a una precipitación lenta y controlada, que consiste en un cambio de fase a través de la cual la macromolécula pasa del estado en solución acuosa al estado cristalino, sólido. Para ello es necesario encontrar las condiciones óptimas en las que se produce este cambio. Los cristales de proteína se obtienen a partir de una disolución sobresaturada en la que las moléculas de soluto se adicionan ordenadamente a un núcleo inicial. La Figura 21 muestra un ejemplo genérico del diagrama de fases que se presenta durante el proceso de cristalización.

El proceso se puede dividir en dos etapas fundamentales: nucleación y crecimiento. La zona metaestable (Figura 21) es la única zona del diagrama de fases en donde se forman núcleos o agregados sobre los cuales se van incorporando moléculas desde la solución. La adición lenta y ordenada de nuevas moléculas de soluto es un factor determinante a la hora de obtener cristales con un buen orden interno, capaces de producir un buen patrón de difracción.

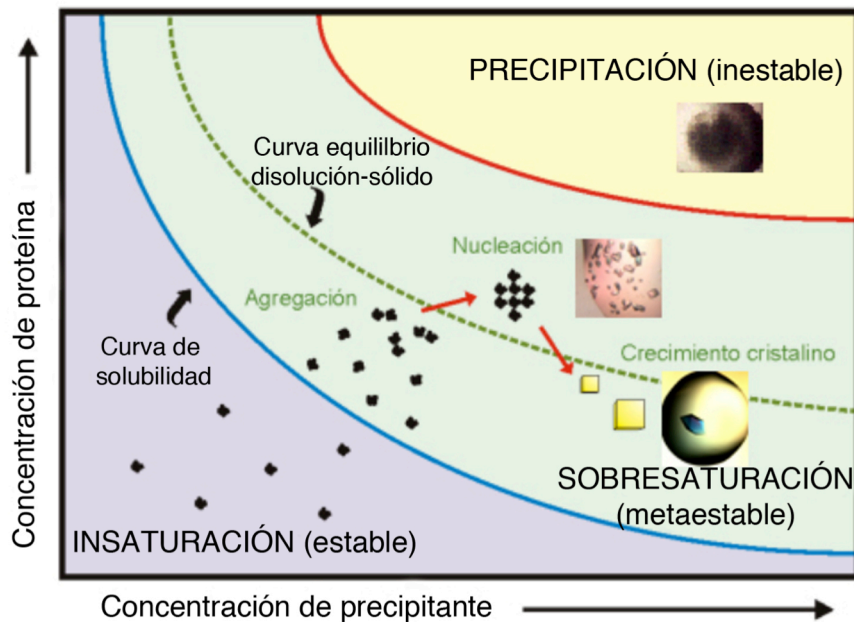


Figura 21. Diagrama de fases del proceso de cristalización.

Aunque la cristalización es un proceso sometido a rigurosas y precisas leyes físico-químicas, en la práctica, la obtención de cristales de proteína se lleva a cabo de una forma muy empírica, dados los numerosos factores que influyen a la hora de inducir sobresaturación en una disolución:

- Pureza de la muestra: es necesario partir de una muestra de elevada pureza. La presencia de contaminantes pueden evitar la formación de cristales.
- Concentración de proteína: dependiente de la solubilidad y estabilidad de cada proteína. Una concentración estándar sería de unos 10 mg/ml.
- Temperatura: normalmente el experimento se lleva a cabo a dos temperaturas: 4 y 20°C.
- pH: afecta a la solubilidad de la proteína. El mínimo de solubilidad se alcanza cerca del punto isoeléctrico de la proteína.
- Concentración de sal: la fuerza iónica afecta de forma muy diferente a la solubilidad de la proteína. Ésta decrece al aumentar la fuerza iónica (efecto "salting-out"). Sin embargo, el mínimo de solubilidad se alcanza con una concentración muy baja de sales (efecto "salting-in").
- Disolventes orgánicos: en muchas ocasiones pueden ayudar al plegamiento adecuado de la proteína.
- PEG: es uno de los precipitantes más comunes. Promueve la separación de fases y la reestructuración del solvente, ayudando a la cristalización.

2.1.3. BÚSQUEDA DE LAS CONDICIONES DE CRISTALIZACIÓN

En general, encontrar las condiciones adecuadas en las que una proteína cristaliza requiere de muchos intentos, dadas las múltiples variables que intervienen en el proceso. A la hora de cristalizar una proteína nueva, no se conoce, *a priori*, ninguna información que indique cuál será la condición de cristalización más favorable, por lo que es imprescindible llevar a cabo búsquedas sistemáticas de soluciones insolubilizantes más adecuadas. Para ello se suelen usar baterías de soluciones preparadas comercialmente, entre las que destacan Crystal Screen I, Crystal Screen II, Salt RX, e Index de la casa comercial Hampton (Hampton Research, CA, USA), y JCSG+Suite y PACT+Suite de QUIAGEN. En nuestro laboratorio contamos, además, con el robot de cristalización Gilson-Innovadine semiautomatizado que permite realizar numerosas pruebas con un coste mínimo de tiempo y cantidad de muestra (tan sólo 250 nl).

Una vez obtenidos algunos cristales iniciales, será necesario poder reproducirlos y optimizarlos, algo que, en muchos casos, puede ser más complicado que la obtención inicial de cristales. Y para ello se suelen utilizar detergentes y aditivos que ayuden a la formación de los mismos y que mejoren su calidad.

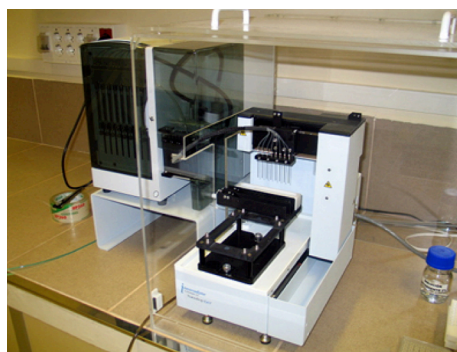


Figura 22. Robot Gilson-Innovadine.

2.1.4. METODOLOGÍAS DE CRISTALIZACIÓN

Aunque existen varios métodos de cristalización, tales como difusión de vapor, contradifusión, diálisis o a través de interfase, en este trabajo se ha utilizado principalmente el método de difusión de vapor, aunque con el objetivo de mejorar la calidad de ciertos cristales también se ha recurrido a la cristalización a través de interfase (microbatch).

- Método de difusión de vapor:

El método de difusión de vapor se puede realizar en gota sentada o colgante, pero la teoría de cristalización subyacente es igual para ambos casos. Se trata de alcanzar la sobresaturación en un pequeño reservorio cerrado herméticamente en donde se mezclan, en una misma gota, un volumen de proteína (normalmente 1 μL) con otro volumen de condición de cristalización, y esta gota se expone a un ambiente que contiene un reservorio con una cantidad mucho mayor de condición de cristalización (500 μL), sin que la gota y la solución del reservorio entren en contacto. Puesto que la presión de vapor es mayor en la gota que en el reservorio, ésta irá perdiendo agua en un proceso de difusión de vapor, hasta que las concentraciones de precipitante en gota y reservorio se igualen (Figura 23).

La diferencia entre ambas modalidades es que con la gota colgante, ésta queda sobre un cubreobjetos de vidrio siliconizado que se coloca invertido sobre el pocillo, cuyo borde se encuentra impregnado de grasa de vacío y que contiene la solución precipitante. Las placas utilizadas en esta técnica de cristalización suelen ser comerciales del tipo Linbro de 24 pocillos (Jena Bioscience).

En el caso de la gota sentada, la gota se ubica sobre una elevación por encima del nivel de la solución de cristalización, y las placas utilizadas contienen normalmente 96 (microplacas) ó 24 pocillos (Jena Bioscience).

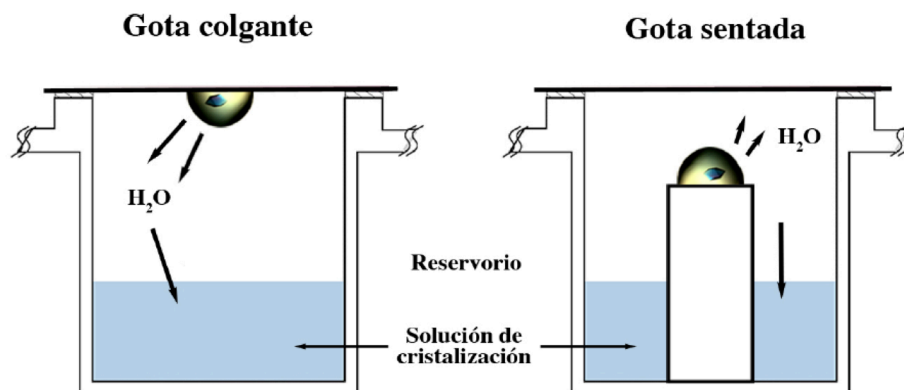


Figura 23. Método de difusión de vapor. Gota colgante y gota sentada.

El tiempo necesario para alcanzar el equilibrio afecta de forma directa al resultado. La formación de cristales, o de precipitados amorfos o cristalinos, depende de la rapidez en alcanzar este equilibrio.

- Microbatch

La técnica de cristalización bajo aceite o *microbatch* (Chayen *et al.*, 1992; Baldock *et al.*, 1996) consiste en mezclar volúmenes iguales de proteína (normalmente 1 μ L) y de condición de cristalización, y recubrirlos de un aceite especial que permite una evaporación muy lenta del agua (Figura 24). Esta técnica se ha utilizado como forma de optimización de los cristales en el caso de la proteína MltE.

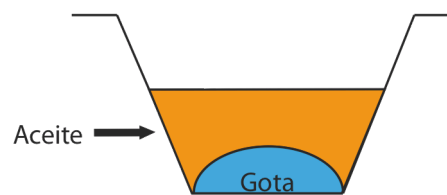


Figura 24. Esquema de la técnica de microbatch.

Una de las ventajas que presenta esta técnica es que los volúmenes de condición de cristalización y de aceite son muy pequeños, sin embargo, su desventaja es que el proceso de evaporación es constante y no se alcanza nunca el equilibrio, como ocurría en el caso de difusión de vapor, por lo que los cristales terminan disolviéndose y desapareciendo.

2.1.5. CRISTALIZACIÓN DE COMPLEJOS PROTEÍNA-LIGANDO

La obtención de complejos proteína-ligando se lleva a cabo en Cristalografía usando dos metodologías diferentes: por inmersión (*soaking*) o por cocrystalización (Hassell *et al.*, 2007).

- Cocrystalización: proteína y ligando se mezclan antes de realizar los experimentos de cristalización, ya sea en el momento del propio ensayo de cristalización o con incubación previa. De esta forma la proteína cristaliza en presencia del ligando.
- Inmersión (*soaking*): un cristal de proteína nativa se sumerge en una solución con ligando. Dicho ligando se difunde entre los canales de solvente del cristal hasta formar el complejo proteína-ligando. Para ello es necesario que el sitio activo sea accesible y que el empaquetamiento de los cristales no sea muy denso, dejando acceso al ligando. Por lo tanto, este método sólo se utiliza en el caso de ligandos de pequeño tamaño, que sean capaces de pasar entre los canales de solvente.

Todos los complejos aquí presentados se obtuvieron a través del método de inmersión.

2.1.6. PREPARACIÓN FINAL DE LA MUESTRA CRISTALINA

Dada la frágil naturaleza de los cristales de proteína, antes de hacer incidir sobre ellos un haz de rayos X es necesario protegerlos mediante enfriamiento. Para ello se hace uso de un flujo continuado de N₂ seco a 100 K y de una solución crioprotectora que modera los daños que provoca la radiación (Garman & Owen, 2006), permitiendo un mayor tiempo de vida del cristal y estabilizando regiones de alta flexibilidad conformacional.

La elección del crioprotector es muy importante para obtener un buen patrón de difracción y depende de la naturaleza de cada proteína (Alcorn & Juers, 2010). Dado el alto contenido en agua que hay en de los cristales de proteína, ésta podría formar hielo al congelarse, dañando el cristal y mostrando los característicos anillos de hielo en el espectro de difracción de la proteína. El crioprotector actúa, pues, desplazando el agua no estructural del cristal, evitando así la formación de cristales de hielo (Rubinson *et al.*, 2000). Para este fin, el cristal objeto de medida se sumerge en la disolución crioprotectora durante unos segundos, se captura con un lazo de nylon (Figura 25) y de forma inmediata se coloca en la cabeza goniométrica del equipo de difracción, bajo un flujo de N₂ seco a una temperatura de unos 100 K.

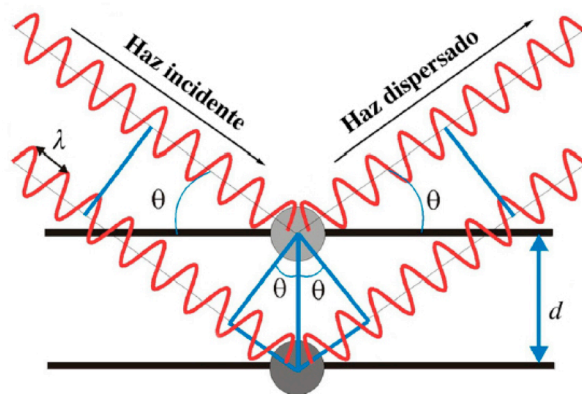


Figura 25. Cristal montado en un lazo de nylon.

2.2. DIFRACCIÓN DE RAYOS X

La difracción de rayos X es el fenómeno físico a través de cual se manifiesta la interacción de los rayos X con los cristales. A través de dicha interacción, los fotones chocan con los electrones de los átomos del mismo, haciéndolos vibrar acopladamente con las variaciones periódicas de su campo eléctrico. Los electrones se convierten así en nuevos focos de radiación X que emiten de forma esférica (dispersión). Al tratarse de una estructura ordenada y periódica, existen determinadas direcciones del espacio, en las que los haces de rayos X dispersados se combinan y refuerzan, dando lugar al fenómeno de la dispersión cooperativa, conocido con el nombre de difracción.

Según la Ley de Bragg, que describe geométricamente este fenómeno, la difracción se produciría como consecuencia de supuestas reflexiones ocurridas sobre planos virtuales, paralelos y distanciados entre sí por un valor constante, d . Para que se produzca esta cooperación, deberá ocurrir que para un determinado ángulo de incidencia, θ , la diferencia del camino recorrido por las ondas, que se reflejan en planos paralelos, debe coincidir con un múltiplo entero de la longitud de onda λ de los rayos X incidentes.



$$2 d \operatorname{sen} \theta = n \lambda$$

Figura 26. Ley de Bragg.

Por lo tanto, en función de este modelo, para que se produzcan todos los haces difractados posibles hay que girar el cristal sobre sí mismo, en todas las direcciones, de tal forma que los planos virtuales se coloquen en la posición adecuada para cumplir la Ley de Bragg (Figura 26).

En la práctica, la medida de un espectro de difracción requiere de:

- Sistema de criogenización: para mantener el cristal a baja temperatura (100K) durante el tiempo de la medida.
- Fuente de rayos X: capaz de generar radiación de energía o longitud de onda e intensidad adecuadas.
- Sistema de oscilación del cristal: se trata de un sistema goniométrico que permite orientar el cristal en cualquier posición.
- Sistema de detección: capaz de captar y digitalizar los haces difractados que incidan sobre el mismo, para que posteriormente puedan ser procesados convenientemente.

2.2.1. FUENTES DE RADIACIÓN Y EQUIPOS DE DIFRACCIÓN

Los rayos X que interesan en cristalografía son aquellos que tienen una longitud de onda aproximada de 1 \AA , distancia parecida a las distancias de enlace entre los átomos. Las fuentes de radiación existentes en la actualidad son de dos tipos: el denominado generador de ánodo rotatorio y las fuentes de radiación sincrotrón. Aunque todos los datos aquí presentados han sido recolectados en fuentes de radiación sincrotrón, en determinadas ocasiones, y a lo largo de todo el trabajo, también se han utilizado fuentes convencionales.

- Generador de ánodo rotatorio

Un generador suministra una diferencia de potencial entre un filamento incandescente (por el que se hace pasar un pequeño voltaje), y un cilindro de metal que funciona como ánodo. Los electrones de alta energía del filamento bombardean el ánodo dispersando electrones de capas internas del metal. Las vacantes así generadas son remplazadas por electrones de capas superiores (de mayor energía). La diferencia de energía entre capas es liberada en forma de radiación. De este modo los picos de radiación producidos corresponden a las energías de las capas internas del ánodo. En el caso del ánodo rotatorio la radiación producida corresponde a la línea K_{α} del cobre, con una longitud de onda de 1.5418 \AA .

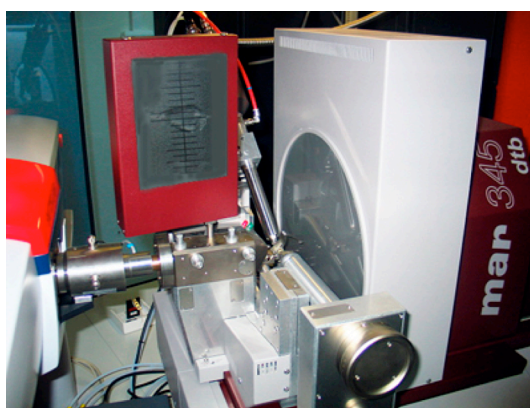


Figura 27. Detalle del generador de rayos X y del detector usado en el Departamento de Cristalografía y Biología Estructural del Rocasolano.

En el caso del ánodo rotatorio la radiación producida corresponde a la línea K_{α} del cobre, con una longitud de onda de 1.5418 \AA .

En el Departamento de Cristalografía y Biología Estructural del Instituto de Química-Física “Rocasolano” (CSIC) se trabaja con un generador de rayos X Brüker-Nonius, un sistema de baja temperatura de Oxford Cryosystems y un detector Image Plate MAR345 acoplado a un goniómetro que permite realizar oscilaciones simples del cristal sobre un solo eje (Figura 27).

- Fuente de radiación sincrotrón

Un sincrotrón es un acelerador de partículas, generalmente electrones, que provoca la emisión de radiación X de altísima intensidad. En él, un haz de partículas se encuentra circulando por el interior de segmentos rectilíneos, a lo largo de un anillo, a velocidades casi relativistas. Cuando el haz es obligado a cambiar de segmento, mediante un electroimán (Figura 28), se produce una radiación electromagnética, tangencial al anillo, denominada radiación sincrotrón.

De entre todas las longitudes de onda de esta radiación se selecciona la radiación X, que es con la que se incide sobre los cristales. Este haz, de altísima energía, permite obtener una mejor resolución de los patrones de difracción, pues al estar altamente colimado, presentar una sección muy pequeña y disponer de altísimo brillo, hace posible la medida de cristales de tamaño muy pequeño, imposibles de medir en los equipos convencionales de un laboratorio.

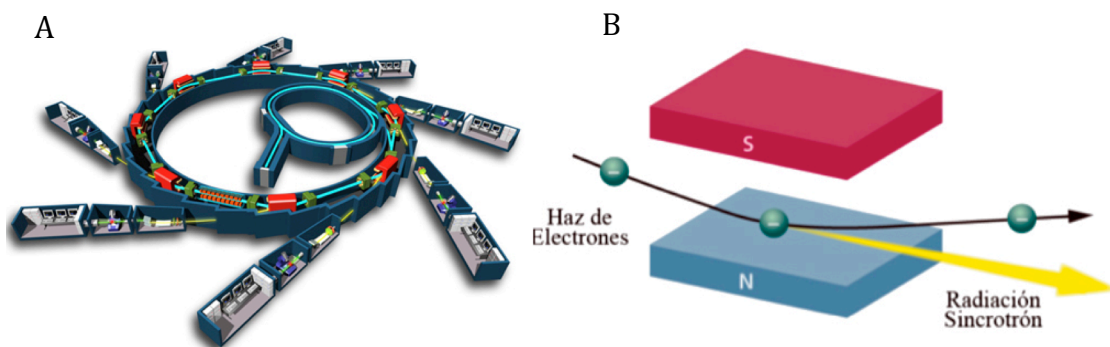


Figura 28. A) Esquema general de un sincrotrón. B) Sistema de imanes para la aceleración y redireccionamiento de las partículas internas de un sincrotrón.

Para este trabajo se utilizaron el sincrotrón ESRF (European Synchrotron Radiation Facility) situado en Grenoble (Francia), el sincrotrón suizo SLS (Swiss Lightsource), y el español ALBA (Barcelona).

2.3. RESOLUCIÓN ESTRUCTURAL

2.3.1. PROCESADO DE DATOS DE DIFRACCIÓN

Un cristal de proteína sumergido en un haz de rayos X, genera patrones de difracción formados por concentraciones discretas de intensidad difractada (puntos o “spots” de difracción generados por las “reflexiones” de Bragg), que contienen la información estructural de nuestra proteína. Cada una de estas intensidades está asociada a un triplete de números (índices de Miller) que genéricamente se representan por las letras hkl .

En la práctica, el procesamiento de datos se divide en distintas etapas:

- **Indexado e integración.** A partir de la posición relativa de los distintos “spots” de difracción, es posible conocer los parámetros que definen la celdilla unidad del cristal. Además, a través del análisis de la simetría espacial que muestra la distribución de intensidades, y de la posible ausencia sistemática de ciertas reflexiones, se obtiene información sobre los posibles grupos espaciales que mejor se ajustan a nuestros datos. Se denomina integración al proceso mediante el cual se evalúa con precisión la intensidad de cada una de las reflexiones.

Para esta etapa se han utilizado los programas IMOSFLM (Leslie *et al.*, 2007; Battye *et al.*, 2011) y XDS (Kabsch, 2010).

- **Escalado.** Las intensidades recolectadas varían en función del poder de difracción del cristal con el tiempo, del volumen de cristal que atraviesa el haz (forma del cristal) según las distintas orientaciones, o de la intensidad del haz, por lo que no se pueden considerar por igual todas las intensidades recogidas en cada imagen. Y a ello se añade el hecho de que durante el experimento se recogen intensidades de tripletes *hkl* diferentes cuyas intensidades son equivalentes por simetría. Es necesario, por tanto, realizar un escalado de las mismas, consistente en comparar reflexiones con índices *hkl* iguales (o equivalentes por simetría) que hayan sido medidas más de una vez, y corregir el valor de estas intensidades, de tal forma que reflexiones iguales tengan finalmente una misma intensidad. Las intensidades promediadas y corregidas se reducen a la unidad asimétrica (la parte independiente del patrón de difracción) y se analiza de forma cuantitativa la calidad de los datos teniendo en cuenta los siguientes criterios:
 - R_{sym}: Indica las diferencias en la intensidad de las reflexiones relacionadas por simetría. Un valor global de menos de un 10% de R_{sym} indica un buen conjunto de datos.
 - I/σ(I): Representa el valor de la razón entre la intensidad de la señal y el ruido de fondo. Son aceptables valores superiores a 2 para la última capa de resolución (intensidades recogidas a ángulos más altos).
 - Multiplicidad: También llamada redundancia. Indica el número de veces que ha sido medida cada reflexión. Una multiplicidad alta permite disminuir los errores intrínsecos asociados a la medida de cada reflexión.
 - Compleitud: Indica el porcentaje de espacio recíproco (patrón de difracción) que ha sido medido. Ésta debe ser entre un 90% y un 100% para todo el experimento, y de al menos un 80% para la última capa de resolución.

Para realizar el escalado de los datos se utilizó SCALA, del paquete informático CCP4 (Collaborative Computacional Project, Number 4; Winn *et al.* 2011).

- **Cálculo del módulo del factor de estructura:** El factor de estructura es la onda resultante del haz difractado en una determinada dirección, y viene caracterizado por su módulo, $|F_{hkl}|$ y su fase ϕ_{hkl} . El módulo representa la amplitud del haz difractado y se calcula directamente a partir de la intensidad medida para dicha reflexión. La fase, por el contrario, como magnitud inobservable, se pierde durante el experimento de difracción, y es necesario estimarla de algún modo, tal como que se verá más adelante.

Para calcular los módulos de los factores de estructura se utilizó el programa TRUNCATE (French & Wilson, 1978) del paquete informático de CCP4.

2.3.2. EL PROBLEMA DE LAS FASES

La función de densidad electrónica (ρ) que se muestra en la Ecuación 1, resume perfectamente la tarea que supone determinar la estructura

$$\rho(x, y, z) = \frac{1}{V} \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}| e^{-2\pi i(hx + ky + lz - \Phi(hkl))}$$

Ecuación 1. Función de densidad electrónica.

interna de un cristal, relacionando dos escenarios perfectamente definidos. El primero de ellos, conocido como espacio real o cristalino y simbolizado por el miembro de la izquierda, $\rho(x,y,z)$, representa la estructura del cristal, es decir, aquellos puntos de coordenadas (x,y,z) en donde la función ρ muestra valores máximos. El segundo escenario, el miembro de la derecha de la Ecuación 1, conocido como espacio recíproco y simbolizado por el patrón de difracción, está constituido por los factores de estructura, magnitudes vectoriales que muestran módulo, $|F_{hkl}|$, y fase, $\Phi(hkl)$. Los módulos, $|F_{hkl}|$, son magnitudes directamente derivables de las medidas experimentales de las intensidades de difracción, pero sus fases relativas, $\Phi(hkl)$, no son físicamente observables. Esta circunstancia, que imposibilita la resolución directa de la mencionada ecuación, y por lo tanto la determinación de las estructuras cristalinas, da nombre al conocido “problema de las fases”.

En el caso de moléculas de pequeño y mediano tamaño es posible solventar dicho problema utilizando los “métodos directos”. El hecho de que la densidad electrónica deba ser cero o positiva, en cualquier punto de la celdilla cristalina, y la atomicidad de las moléculas, genera ciertas limitaciones en la distribución de fases asociada a los factores de estructura. En dicho contexto, los métodos directos están basados en el establecimiento de sistemas de ecuaciones que usan las intensidades de los haces difractados y que describen dichas limitaciones. La resolución de dichos sistemas de ecuaciones proporciona información directa sobre la distribución de fases. Sin embargo, puesto que la validez de cada una de estas ecuaciones se establece en términos probabilísticos, es necesario disponer de un gran número de ecuaciones que sobredeterminen los valores de las incógnitas de la Ecuación 1, es decir, de las fases $\Phi(hkl)$.

En macromoléculas, los métodos directos son muy difíciles de aplicar dado el elevadísimo número de variables, por lo que se utilizan métodos indirectos, tales como:

- Reemplazo Múltiple Isomorfo, MIR (Multiple Isomorphous Replacement), fundamentado en el efecto que produce en la difracción la introducción de átomos altamente dispersores, y por lo tanto basado en el método de Patterson.
- Difracción Anómala Múltiple, MAD (Multi-wavelength Anomalous Diffraction), basado en la introducción de átomos que se comportan como dispersores anómalos para la longitud de onda incidente.
- Reemplazo Molecular, MR (Molecular Replacement), que hace uso de un modelo estructural de una proteína homóloga, de estructura previamente

conocida. Este método se ha utilizado en esta Tesis para resolver las estructuras de las enzimas AmpDh2 y AmpDh3, con sus respectivos complejos.

- *Ab initio*. El programa ARCIMBOLDO (Rodríguez *et al.*, 2012) es capaz de obtener fases *de novo* combinando la búsqueda de fragmentos de estructura conocida (como pequeñas α -hélices) y mejorarlas mediante la técnica de modificación de densidad electrónica. Por tratarse de un programa todavía en desarrollo, presenta ciertas limitaciones, y actualmente su éxito viene condicionado a disponer de datos a alta resolución ($<2 \text{ \AA}$), un número relativamente bajo de aminoácidos (< 200), y un número elevado de α -hélices. Mediante este programa se han podido resolver las estructuras de las proteínas MltE y MltC que se presentan en este trabajo. Estas dos estructuras han supuesto un hito en la determinación estructural *de novo*.

2.3.3. REEMPLAZO MOLECULAR

Tal como se indicó en el apartado anterior, cuando se dispone de un modelo estructural de una proteína con una secuencia de aminoácidos homóloga, el problema de la fase se puede resolver mediante la técnica del reemplazo molecular (MR). Este procedimiento está basado en la observación de que proteínas homólogas en su secuencia peptídica, muestran un plegamiento muy similar. El problema en este caso, consiste en transferir la estructura molecular de la proteína conocida, desde su propio empaquetamiento cristalino hasta el cristal de la proteína con estructura desconocida. El posicionamiento de la molécula conocida en la celdilla unidad de la proteína desconocida, requiere determinar su correcta orientación y su posición precisa. Ambas operaciones, rotación y translación, se calculan mediante las funciones denominadas de rotación y de translación (Figura 29).

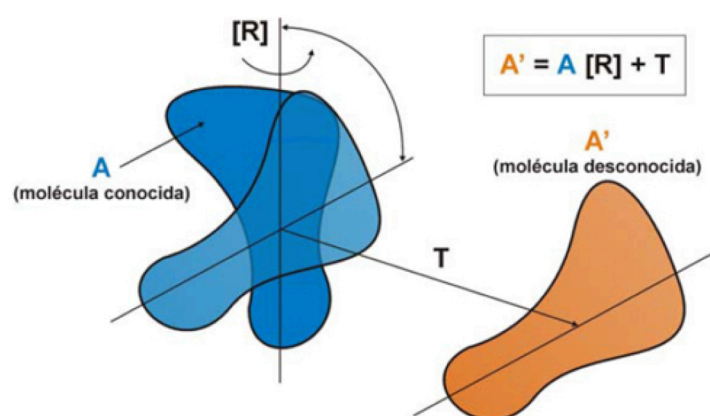


Figura 29. El Reemplazo Molecular de una molécula conocida A que a través de funciones de traslación y rotación se coloca en la posición de la proteína a determinar.

La calidad de las soluciones obtenidas se determina a través de un coeficiente de correlación (CC). Un CC alto indica un buen acuerdo entre el espectro de difracción experimental y el calculado con la proteína conocida. Una vez colocado el modelo, se calcula el mapa de densidad electrónica usando las amplitudes experimentales de nuestra proteína y las fases obtenidas a partir del modelo.

Esta es la estrategia que suele utilizarse también en el caso de los complejos proteína-ligando. A pesar de que es muy probable que hayan cambios conformacionales de la proteína al unirse a un ligando, la estructura global se mantiene fija, por lo que es posible calcular las fases de los complejos partiendo de las fases de la proteína nativa, como ha ocurrido en este trabajo en el caso de los complejos de AmpDh2 y AmpDh3. El programa utilizado para realizar el reemplazo molecular de todos los complejos ha sido MOLREP (Vagin & Teplyakov, 1997).

2.3.4. REFINAMIENTO ESTRUCTURAL

Una vez estimada una primera distribución de fases aproximadas para los factores de estructura, se procede a calcular el mapa de densidad electrónica inicial de la proteína. Este mapa inicial contendrá errores derivados de las fases, por lo que hay que proceder a su mejora y ajuste para optimizar no sólo la concordancia entre los factores de estructura observados en el experimento de difracción y los calculados con el modelo, sino la capacidad predictiva del mapa para mostrar los pequeños detalles de la estructura objeto del estudio. Para ello hay que proceder a mejorar el modelo, modificando las coordenadas atómicas para que se ajusten mejor a la predicción del mapa, y con el modelo modificado se recalcula un nuevo mapa. Mediante ciclos sucesivos de esta estrategia el mapa de densidad electrónica y el modelo deberán ir ajustándose uno a otro, al mismo tiempo que los módulos de los factores de estructura calculados con dicho modelo ($|F_{\text{calc}}|$) irán aproximándose a los valores experimentales ($|F_{\text{obs}}|$). En este proceso se utilizan también algoritmos de mínimos cuadrados, aunque hoy en día se están implantando nuevos métodos como el refinamiento energético o métodos basados en estadísticas Bayesianas.

En las primeras etapas del refinamiento de mínimos cuadrados se suele utilizar el denominado refinamiento de cuerpo rígido (*Rigid body*), en el que se mantiene la estructura de la proteína como un “todo” que se modifica únicamente mediante giros y traslaciones. También es común hacer un Recocido Simulado (*Simulated Annealing*), que consiste en “calentar” computacionalmente la estructura de la proteína para enfriarla poco a poco y obtener su estructura estabilizada.

En el proceso iterativo de mejora del modelo se tienen en cuenta las coordenadas (x,y,z) de cada átomo y el factor térmico isotrópico B , que expresa el estado de vibración de cada átomo en torno a su posición de equilibrio. En ocasiones, cuando aparecen situaciones de conformación alternativa para determinados residuos también es necesario ajustar el llamado factor de ocupación (normalmente 1), que representa la fracción de átomo que ocupa una posición dentro de la celdilla.

Uno de los criterios fundamentales para decidir sobre la calidad del modelo final es el factor de desacuerdo R . Éste debe disminuir a lo largo del refinamiento, aunque un valor bajo de R no significa que el modelo sea correcto. Por ello se utiliza un método estadístico de validación cruzada basado en el cálculo de un segundo factor de convergencia, el denominado R_{free} . El factor R_{free} se calcula a partir de una serie de factores de estructura (5-10% del total) escogidos de forma aleatoria y que no se utilizan durante el refinamiento. El R_{free} medirá el desacuerdo entre el modelo refinado y las reflexiones no utilizadas (Ecuación 2), lo que significa que únicamente serán válidos los cambios en el modelo que disminuyan el R_{free} .

$$R = \frac{\sum ||F_{\text{obs}}| - |F_{\text{calc}}||}{\sum |F_{\text{obs}}|}$$

Ecuación 2. Fórmula del factor de desacuerdo R .

Para el proceso de refinamiento se han utilizado los programas REFMAC (Murshudov *et al.*, 1997) y PHENIX (Adams *et al.*, 2010).

2.3.5. MODELADO MANUAL Y VALIDACIÓN DEL MODELO

El patrón de difracción de una proteína no suele proporcionar intensidades medibles en las zonas de mayor resolución, es decir, en las zonas de mayor ángulo de Bragg, por lo que normalmente no se dispone de una sobredeterminación adecuada de datos experimentales (intensidades de difracción) para la cantidad de variables que contiene la estructura. Por este motivo, el ajuste matemático no es capaz de eliminar todos los errores posibles del modelo que se está ajustando, lo que hace imprescindible una etapa de modelado manual previa a cada ciclo nuevo de refinamiento mediante mínimos cuadrados.

Posibles errores de un modelo inicial pueden ser:

- Colocación incorrecta de la cadena principal o las cadenas laterales,
- Errores en la secuencia de aminoácidos,
- Incorrecta conectividad de los átomos,
- Presencia de ligandos en el modelo final.

Todos estos errores se pueden solventar de forma manual utilizando el programa COOT (Emsley *et al.*, 2010), que representa los mapas de densidad con coeficientes tales como $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ y $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$, los cuales ayudan a determinar las zonas con densidades electrónicas positiva y negativa.

El modelo estructural se puede dar por concluido cuando éste se ajusta al mapa de densidad electrónica y los factores R y R_{free} convergen hasta valores entre 20-25% y <30%, respectivamente, aunque estos valores dependen de la calidad del patrón de difracción.

El modelo final debe, además, cumplir con los requisitos mínimos de una estereoquímica correcta, es decir, que las distancias y ángulos de enlace sean adecuados y que no se provoquen choques entre átomos, tanto intra- como intermoleculares. Al mismo tiempo, debido al carácter geométrico del enlace peptídico (enlace entre dos aminoácidos consecutivos), ha de cumplirse que el ángulo de torsión de dicho enlace esté dentro del intervalo de valores aceptables para la conformación estructural que adoptan los aminoácidos correspondientes, tal como muestra el denominado diagrama de Ramachandran. Todos estos parámetros se analizan con el programa MOLPROBITY (Chen *et al.*, 2010).

2.4. OTROS PROGRAMAS UTILIZADOS

Otros programas utilizados en este trabajo son los relacionados con:

- **Alineamiento de secuencias**

La mayoría de las secuencias se alinearon utilizando el programa BLAST (Atschul *et al.*, 1990; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y CLUSTALW (Larkin *et al.*, 2007; <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

- **Análisis de estructura secundaria**

El análisis de la estructura secundaria de los modelos estructurales obtenidos se realizó mediante el programa PROCHECK (Laskowski *et al.*, 1993) que revisa toda la estereoquímica de la molécula.

- **Figuras**

Para la preparación de figuras se usó, fundamentalmente, el programa PYMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2r3pre, Schrödinger, LLC).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS.

Nuestro trabajo se ha centrado en la caracterización estructural de cuatro proteínas claves en el remodelado de la pared bacteriana de organismos Gram-negativos: MltE, MltC (ambas de *E. coli*) y AmpDh2 y AmpDh3 (de *P. aeruginosa*). Todas ellas son posibles dianas terapéuticas, ya que cada una desempeña una función específica en el proceso de reciclaje de la pared celular y la resistencia a antibióticos.

El análisis estructural de estas enzimas podría aclarar los procesos biológicos en los que están implicadas. Así pues, para cada una de las cuatro proteínas objeto de esta Tesis, se han planteado los siguientes objetivos concretos:

Transglicosilasa lítica anclada a membrana E (MltE) de *Escherichia coli*.

- Cristalización y determinación estructural de MltE por Cristalografía de rayos X.
- Caracterización de las bases moleculares de su actividad endolítica.
- Caracterización del mecanismo de anclaje a la membrana y de interacción con el peptidoglicano.
- Caracterización de los intermedios de reacción que lleva a cabo la MltE mediante el método híbrido Mecánica Cuántica/Mecánica Molecular (QM/MM).

Transglicosilasa lítica anclada a membrana C (MltC) de *Escherichia coli*.

- Cristalización y determinación de la estructura cristalográfica de MltC, así como el estudio de su estructura en complejo con análogos sintéticos de peptidoglicano.
- Caracterización y función del dominio adicional de MltC
- Caracterización de las bases moleculares de su actividad exolítica y endolítica
- Caracterización de las bases estructurales del reconocimiento de peptidoglicano.

OBJETIVOS

Peptidoglicano amidasa AmpDh2 de *Pseudomonas aeruginosa*.

- Determinación estructural de los complejos de AmpDh2 con diferentes análogos de PG mediante cristalografía de rayos X.
- Análisis estructural y caracterización de las bases moleculares del reconocimiento y la actividad de AmpDh2.
- Identificación de su mecanismo de acción y regulación.

Peptidoglicano amidasa AmpDh3 de *Pseudomonas aeruginosa*.

- Determinación estructural de los complejos de AmpDh3 con diferentes análogos de PG mediante cristalografía de rayos X.
- Análisis estructural y caracterización de las bases moleculares del reconocimiento y la actividad de AmpDh3.
- Identificación de su mecanismo de acción y regulación.

TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN

4. ARTÍCULO 1:

Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the lytic transglycosylase MltE from *Escherichia coli*.

***Acta Crystallographica* (2011) F67, 161-163**

4.1. INTRODUCCIÓN A LA CRISTALIZACIÓN DE LA TRANSGLICOSILASA LÍTICA MltE Y APORTACIÓN DEL AUTOR.

La obtención de cristales de proteína es el paso previo fundamental para la resolución estructural de la molécula y el posterior análisis de la estructura.

Las transglucosilasas líticas son enzimas fundamentales para la supervivencia de *E. coli* (y el resto de organismos Gram-negativos), puesto que comienzan el proceso de reciclaje del peptidoglicano. MltE es una LT encargada de romper el enlace glicosídico β -1,4 entre los azúcares NAM-NAG que forman la red de peptidoglicano, en una reacción no hidrolítica. Los productos de la reacción de las LTs son internalizados al citoplasma a través de la permeasa AmpG, donde continúan el ciclo de reciclaje de PG.

MltE (194 residuos, 21,4 KDa) es una enzima anclada a la parte interna de la membrana externa de *E. coli*. MltE juega un papel fundamental en el reciclaje de la pared celular por ser la única LT con actividad esencialmente endolítica.

Con este trabajo se han querido dar respuesta a las siguientes cuestiones:

- Cuál es el protocolo de expresión y purificación de MltE
- Cuáles son las condiciones óptimas de cristalización de MltE
- Cómo son las estadísticas de los datos utilizados para resolver la estructura cristalográfica de MltE

La autora de esta Tesis se ha encargado de cristalizar la proteína, así como de la recolección de los datos en el sincrotrón de ESRF (Grenoble, Francia) y del procesado de los mismos.

4.2. PUBLICACIÓN



crystallization communications

Acta Crystallographica Section F
Structural Biology
and Crystallization
Communications

ISSN 1744-3091

Cecilia Artola-Recolons,^a
Leticia I. Llarrull,^b Elena
Lastochkin,^b Shahriar
Mobashery^b and Juan A.
Hermoso^{a*}

^aDepartment of Crystallography and Structural
Biology, Instituto de Química-Física
'Rocasolano', Consejo Superior de
Investigaciones Científicas, Serrano 119,
Madrid 28006, Spain, and ^bDepartment of
Chemistry and Biochemistry, Nieuwland
Science Hall, Notre Dame, Indiana 46556, USA

Correspondence e-mail: xjuan@iqfr.csic.es

Received 7 October 2010
Accepted 24 November 2010

Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the lytic transglycosylase MltE from *Escherichia coli*

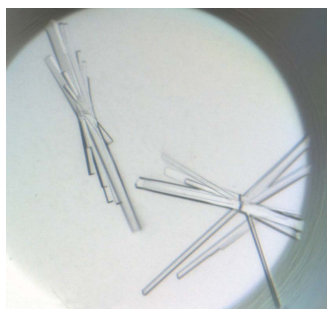
MltE from *Escherichia coli* (193 amino acids, 21 380 Da) is a lytic transglycosylase that initiates the first step of cell-wall recycling. This enzyme is responsible for the cleavage of the cell-wall peptidoglycan at the β -1,4-glycosidic bond between the *N*-acetylglucosamine and *N*-acetylmuramic acid units. At the end this reaction generates a disaccharide that is internalized and initiates the recycling process. To obtain insights into the biological functions of MltE, crystallization trials were performed and crystals of MltE protein that were suitable for X-ray diffraction analysis were obtained. The MltE protein of *E. coli* was crystallized using the hanging-drop vapour-diffusion method at 291 K. Crystals grew from a mixture consisting of 28% polyethylene glycol 4000, 0.1 M Tris pH 8.4 and 0.2 M magnesium chloride. Further optimization was performed using the microbatch technique. Single crystals were obtained that belonged to the orthorhombic space group $C222_1$, with unit-cell parameters $a = 123.32$, $b = 183.93$, $c = 35.29$ Å, and diffracted to a resolution of 2.1 Å.

1. Introduction

The bacterial cell wall is comprised of cross-linked strands of peptidoglycan which encase the entire cytoplasm. A healthy cell wall is critical for the survival of bacteria. During homeostatic processes, including growth, the cell wall is simultaneously biosynthesized and degraded. This recycling event is little understood; it is an integral process that takes place during normal bacterial growth but also in response to damage that the cell wall might experience in response to antibiotic action. In Gram-negative bacteria the peptidoglycan is a thin layer that surrounds the cytoplasmic membrane and consists of repeats of *N*-acetylglucosamine (NAG) and *N*-acetylmuramic acid (NAM) units. The NAM unit typically has a pentapeptide stem attached to it. The NAG-NAM disaccharide, as introduced by bacterial lipid II, is polymerized by the action of transglycosylases and the pentapeptide stems undergo cross-linking to neighbouring strands in the final steps (Hesek *et al.*, 2009; Suvorov *et al.*, 2008).

The recycling process essentially reverses these events using an unusual reaction performed by lytic transglycosylases. The details of the reactions of these enzymes are currently under investigation, but the process is not hydrolytic. It requires entrapment of the C₆ hydroxyl of the muramic acid, giving rise to a 1,6-anhydromuramyl moiety in the product. The product of the lytic transglycosylase reaction liberates one disaccharide at a time from the peptidoglycan structure. This reaction product is subsequently internalized into the cytoplasm by the permease AmpG, where it is converted into a series of derivatives en route to recycling into lipid II, which is introduced into the nascent cell wall (Suvorov *et al.*, 2008). Hence, the process repeats itself.

In *Escherichia coli* there are seven known lytic transglycosylases (Powell *et al.*, 2006): six are bound to the outer membrane (MltA, MltB, MltC, MltD, MltE and MltF) and one is soluble (Slt70) and is located in the periplasm. Three families have been defined for these enzymes: family 1 is comprised of Slt70, MltC, MltD, MltE and MltF, and families 2 and 3 are made up of single examples, the enzymes MltA (van Straaten *et al.*, 2007) and MltB (van Asselt, Dijkstra *et al.*,



© 2011 International Union of Crystallography
All rights reserved

crystallization communications

1999), respectively. The specific function of each of these transglycosylases in peptidoglycan recycling is presently unknown, although they all play an active part in degradation of the cell wall.

All of the lytic transglycosylases seem to act as exoenzymes (Madoori & Thunnissen, 2010), with the sole exception of MltE, which has been shown to be an endoenzyme. The exolytic transglycosylases start their cleavage at one end of the peptidoglycan (this end is still unknown) and degrade it in a processive way, while MltE acts as an endoenzyme and does not need an end to start its function.

Here, we describe the preliminary results obtained for the crystallization of MltE, an endo-acting lytic transglycosylase, and the preliminary diffraction analysis of crystals diffracting to a resolution of 2.1 Å.

2. Experimental procedures

2.1. Expression and purification of MltE

The gene encoding the lytic transglycosylase MltE (amino acids 18–203) was amplified from the *Escherichia coli* K12 substrain MG1655 chromosome using high-fidelity *Pfu* Ultra II Fusion HS DNA Polymerase (Stratagene) and the following oligonucleotide primers: mltE_fw_NdeI, 5'-AGATATACATATGAAGCATGACTATACGAAC-3', and mltE_rv_XhoI, 5'-ATCTCGAGCATCGCGTC-CAGTGC-3'. The primer mltE_fw_NdeI introduced an S18M amino-acid substitution. The PCR product was cloned into pET-24a(+) vector from Novagen to give a gene that codes for MltE (amino acids 18–203; S18M) with a C-terminal His₆ tag preceded by two additional amino acids (LE). The complete sequence of the peptide tag fused to the C-terminus of MltE was LEHHHHHH. The protein (194 amino acids, 21 385 Da) was expressed in *E. coli* BL21 (DE3). Cells containing the plasmid were selected on LB-agar supplemented with 50 µg ml⁻¹ kanamycin. The transformants were inoculated overnight in 5 ml Luria-Bertani (LB) medium with 50 µg ml⁻¹ kanamycin. This culture was used to inoculate 500 ml LB medium supplemented with 50 µg ml⁻¹ kanamycin in a 3 l Erlenmeyer flask, which was grown at 310 K and 120 rev min⁻¹. Protein expression was induced at an OD₆₀₀ of 0.8 with 0.4 mM isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) and incubation was continued at 288 K for 12 h to minimize the presence of inclusion bodies. Cells were harvested by centrifugation for 30 min at 3220g and 277 K and the cell pellet was resuspended in 10 ml 20 mM HEPES buffer pH 7.0 supplemented with 0.5 M NaCl, 10% glycerol, 25 mM imidazole and 0.1% Triton X-100. The protein was released from the cells by sonification on ice (ten cycles of 2 min

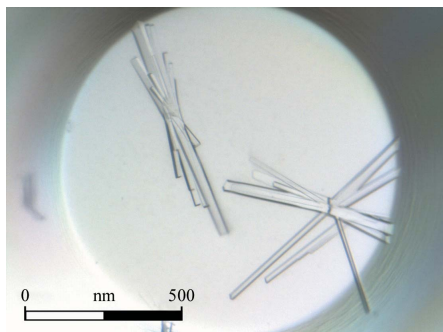


Figure 1
MltE crystals obtained using the microbatch technique with a precipitant consisting of 28% polyethylene glycol 4000, 0.1 M Tris pH 8.4 and 0.2 M magnesium chloride.

Table 1

Data-collection statistics for MltE.

Values in parentheses are for the highest resolution shell.

Crystal data	
Space group	C222 ₁
Unit-cell parameters	
<i>a</i> (Å)	123.32
<i>b</i> (Å)	183.93
<i>c</i> (Å)	35.29
$\alpha = \beta = \gamma$ (°)	90
Data collection	
Temperature (K)	100
Radiation source	Synchrotron
Detector	CCD
Wavelength (Å)	0.8726
Resolution range (Å)	19.26–2.11 (2.25–2.11)
No. of images	180
Rotation range per image (°)	1.0
Measured reflections	199120
Unique data	27678
Multiplicity	7.2 (7.3)
Data completeness (%)	99.9 (100.0)
Average <i>I</i> /σ(<i>I</i>)	12.1 (3.0)
<i>R</i> _{merge} †	0.11 (0.41)

$$\dagger R_{\text{merge}} = \sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I(hkl) \rangle| / \sum_{hkl} \sum_i I_i(hkl).$$

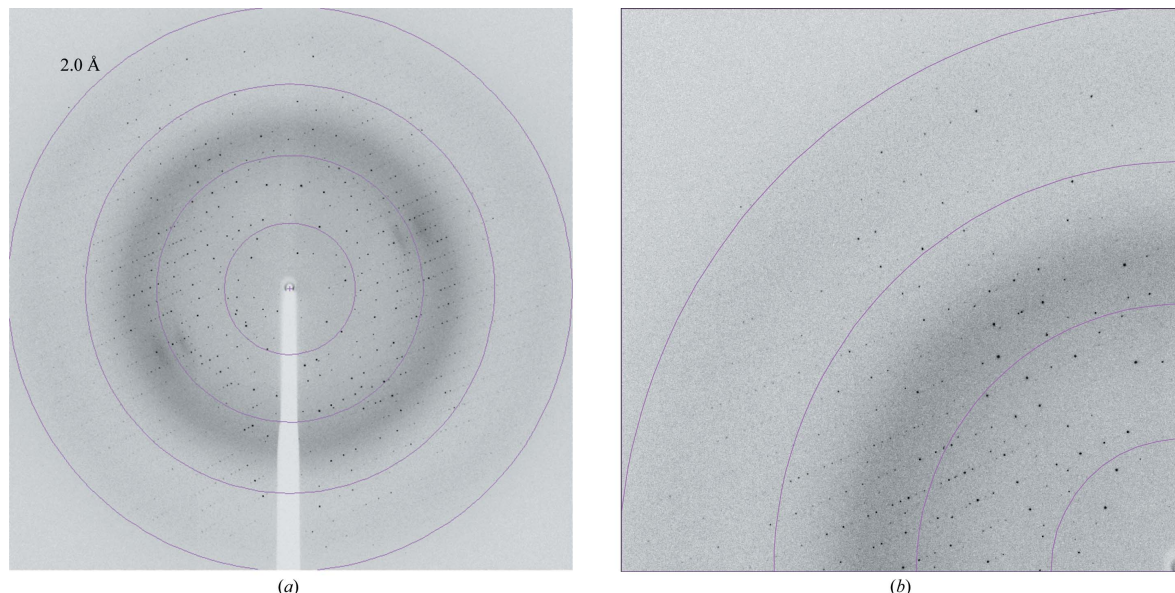
pulsed sonification with 1 min rest between sonification cycles using a Branson 450 Sonifier). The cell extract was then centrifuged for 45 min at 18 514g and 277 K. The supernatant was loaded onto a 5 ml HiTrap Chelating HP column (GE Healthcare) prepared with NiSO₄. The column was washed with 10 ml 20 mM HEPES buffer pH 7.0, 0.5 M NaCl, 10% glycerol, 25 mM imidazole and 0.1% Triton X-100 (buffer A). Elution was performed using a gradient from 0 to 100% buffer B (20 mM HEPES buffer pH 7.0, 0.5 M NaCl, 10% glycerol, 500 mM imidazole and 0.1% Triton X-100). After dialysis against 20 mM HEPES buffer pH 7.0, 0.25 M NaCl and 0.1% Triton X-100, the protein concentration was determined using the Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent with a solution of bovine serum albumin (BSA) of known concentration as a standard.

2.2. Crystallization

Initial crystallization trials were performed by the sitting-drop vapour-diffusion method at 291 K in Innovaplate SD-2 microplates (Innovadyne Technologies Inc., California, USA), mixing 250 nl protein solution with 250 nl precipitant solution and equilibrating against 65 µl well solution. Crystallization conditions were assayed by high-throughput techniques using a NanoDrop robot (Innovadyne Technologies Inc.) with native MltE at a concentration of 22 mg ml⁻¹ in 25 mM HEPES pH 7.0, 100 mM NaCl and 0.1% Triton X-100. The PACT Suite and JCSG+ Suite from Qiagen (Düsseldorf, Germany) and Crystal Screen, Crystal Screen 2, Crystal Screen Lite, Index HT and SaltRX from Hampton Research (Aliso Viejo, USA) were tested. Successful initial conditions were optimized using hanging-drop methods by mixing 1 µl protein solution with 1 µl precipitant solution and equilibrating against 500 µl reservoir solution. Further crystallization experiments were performed by the microbatch technique, using 8 ml of Al's oil from Hampton Research and mixing 1 µl protein solution with 1 µl precipitant solution.

2.3. X-ray data collection and processing

All crystals were soaked for 5 s in 1 µl cryoprotective solution consisting of 15% (v/v) PEG 400 in the crystallization solution and then flash-cooled to 100 K using a cryogenic system. A native data set was collected using synchrotron radiation on beamline ID23-2 at the ESRF (Grenoble, France) using a CCD detector and a fixed wave-

**Figure 2**

(a) Diffraction image of an MltE crystal diffracting to 2.1 Å resolution (oscillation range 1.0°); (b) enlargement showing the highest resolution area.

length of 0.8726 Å. The images collected were processed and scaled using *XDS* (Kabsch, 1993, 2010), and using *iMOSFLM* (Leslie, 2006) and *SCALA* (Collaborative Computational Project, Number 4, 1994). The two methods produced the same results.

2.4. Preliminary structure solution

Structure determination was initiated using the catalytic domain of the *E. coli* Slt70 structure (PDB code 1qsa; van Asselt, Thunnissen *et al.*, 1999), which shows 34% sequence identity, as an initial model for the molecular-replacement method using *MOLREP* (Vagin & Teplyakov, 2010).

3. Results

After performing initial screening experiments, native MltE crystals were obtained from three different conditions: (i) 20%(w/v) PEG 6000, 0.1 M MES pH 6.0 and 0.2 M calcium chloride, (ii) 20%(w/v) MPD, 0.1 M Tris pH 8.5 and (iii) 30%(w/v) PEG 4000, 0.1 M Tris pH 8.5 and 0.2 M magnesium chloride. Only condition (iii) was scaled up for further optimization.

The best crystals, which had maximum dimensions of about 0.20 × 0.10 × 0.05 mm, were obtained using the microbatch technique from precipitant consisting of 28%(w/v) PEG 4000, 0.1 M Tris pH 8.4 and 0.2 M magnesium chloride in one week (Fig. 1).

An X-ray data set from a single MltE crystal was collected to 2.1 Å resolution and displayed a well defined diffraction pattern (Fig. 2). The X-ray diffraction data were processed and showed good data-collection statistics (Table 1). The crystals belonged to the orthorhombic space group *C222*₁, with unit-cell parameters *a* = 123.32, *b* = 183.93, *c* = 35.29 Å. Specific volume calculations based on the molecular weight of MltE (193 amino acids, 21 380 Da) and the unit-cell parameters indicated the probable presence of two molecules in the asymmetric unit, with 46.45% solvent content and a Matthews

coefficient *V*_M of 2.30 Å³ Da⁻¹ (Matthews, 1968). Structural determination of the MltE protein is currently in progress.

The authors thank the staff of the ID23-2 beamline at the ESRF for support during synchrotron data collection. This work was supported by grants from the Spanish Ministry of Science and Technology (BFU2008-01711 and the Factoría de Cristalización from CONSO-LIDER-INGENIO 2010) and the COMBACT program (S-BIO-0260/2006). The work in the USA was supported by the National Institutes of Health. CA-R is a fellow of the Spanish Ministry of Education and Science (BFU2008-01711/BMC). LIL is a Pew Latin American Fellow in the Biomedical Sciences supported by The Pew Charitable Trusts. The opinions expressed are those of the authors and do not necessarily reflect the views of The Pew Charitable Trusts.

References

- Asselt, E. J. van, Dijkstra, A. J., Kalk, K. H., Takacs, B., Keck, W. & Dijkstra, B. W. (1999). *Structure*, **7**, 1167–1180.
- Asselt, E. J. van, Thunnissen, A. M. & Dijkstra, B. W. (1999). *J. Mol. Biol.* **291**, 877–898.
- Collaborative Computational Project, Number 4 (1994). *Acta Cryst.* **D50**, 760–763.
- Hesek, D., Lee, M., Zhang, W., Noll, B. C. & Mobashery, S. (2009). *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 5187–5193.
- Kabsch, W. (1993). *J. Appl. Cryst.* **26**, 795–800.
- Kabsch, W. (2010). *Acta Cryst.* **D66**, 125–132.
- Leslie, A. G. W. (2006). *Acta Cryst.* **D62**, 48–57.
- Madoori, P. K. & Thunnissen, A.-M. W. H. (2010). *Acta Cryst.* **F66**, 534–538.
- Matthews, B. W. (1968). *J. Mol. Biol.* **33**, 491–497.
- Powell, A. J., Liu, Z.-J., Nicholas, R. A. & Davies, C. (2006). *J. Mol. Biol.* **359**, 122–136.
- Straaten, K. E. van, Barends, T. R., Dijkstra, B. W. & Thunnissen, A.-M. (2007). *J. Biol. Chem.* **282**, 21197–21205.
- Suvorov, M., Lee, M., Hesek, D., Boggess, B. & Mobashery, S. (2008). *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 11878–11879.
- Vagin, A. & Teplyakov, A. (2010). *Acta Cryst.* **D66**, 22–25.

4.3. DISCUSIÓN

La MltE se expresó y purificó con cola de histidinas en el tampón regulador 25 mM Hepes pH 7, 0,1 M de cloruro sódico (NaCl) y 0,1% de detergente Tritón X-100.

Se probaron más de 700 condiciones distintas de cristalización utilizando baterías de soluciones comerciales, en donde se obtuvieron unos cristales iniciales. MltE cristalizó a 22 mg/ml en la condición de cristalización: 28% de polietilenglicol 4000, 0,1 M Tris pH 8 y 0.2 M de cloruro de magnesio (MgCl₂). La optimización de estos cristales se hizo utilizando la técnica de cristalización bajo aceite (*microbatch*).

Para crioproteger los cristales se utilizó 15% de PEG 400 y se congelaron en N₂ líquido a 100 K. Los datos de difracción de uno de los cristales de MltE se tomaron en el sincrotrón ESRF (Grenoble, Francia) a 2,1 Å de resolución, con buenas estadísticas.

Los cristales de MltE pertenecen posiblemente al grupo espacial C222₁ ortorrómbico, con parámetros de celdilla $a = 123 \text{ Å}$, $b = 183 \text{ Å}$ y $c = 35 \text{ Å}$, y presentaría dos moléculas por unidad asimétrica.

De este trabajo se ha podido concluir:

- Se ha expresado y purificado la transglicosilasa lítica MltE
- Se han obtenido las condiciones de cristalización óptimas para obtener cristales de MltE
- Se ha conocido el posible grupo espacial de la MltE, así como sus parámetros de celdilla
- Se ha recogido un set de datos apropiado para la determinación estructural de la enzima.

5. ARTÍCULO 2:

High-Resolution Crystal Structure of an Outer Membrane-Anchored Endolytic Peptidoglycan Lytic Transglycosylase (MltE) from *Escherichia coli*.

Biochemistry (2011) 50, 2384-2386

5.1. INTRODUCCIÓN A LA TRANSGLICOSILASA LÍTICA MLTE Y APORTACIÓN DEL AUTOR.

El proceso de reciclaje de pared bacteriana es fundamental para mantener la integridad celular y está directamente implicado en el desarrollo de nuevas resistencias. Las transglucosilasas líticas inician este proceso. Son responsables de romper el enlace glicosídico β -1,4 entre los azúcares NAM-NAG del peptidoglicano. Se trata de una reacción inusual, ya que no es una hidrólisis común, sino que se produce un ataque intramolecular formando así el 1,6-anhidroNAM-NAG, producto característico de las LTs.

Estas enzimas tienen un papel fundamental en funciones celulares básicas como el crecimiento y la división celular, así como la inserción de nuevo material, como pueden ser flagelos o mecanismos de secreción. Debido a su capacidad autolítica, es necesario mantener un control de la ruptura del PG. En este sentido, es posible que las múltiples LTs dentro de un mismo organismo estén regulando, de alguna forma, el comienzo de este proceso.

Escherichia coli posee siete LTs, seis de las cuales se encuentran ancladas a la membrana, entre las que se encuentra MltE, y una soluble (Slt70). MltE es la única entre estas siete LTs de *E. coli* que presenta una actividad esencialmente endolítica (capaz de hidrolizar en mitad de las cadenas de PG).

En este trabajo se ha querido dar respuesta a las siguientes cuestiones:

- Los diferentes productos de reacción de la MltE respecto de las otras LTs en *E. coli*. Estos productos son básicamente tetra y hexasacáridos (en comparación con los disacáridos del resto de LTs), lo que indica que la MltE es una enzima endolítica. ¿Cuáles son las claves moleculares de esta actividad?
- Cómo se produce el anclaje de la enzima a la pared celular
- Mecanismo de unión e hidrólisis de la cadena de peptidoglicano.

En esta publicación, la autora de esta Tesis se ha encargado de cristalizar la proteína y resolver su estructura, así como del análisis estructural y de elucidar el innovador mecanismo de reacción que debería tener esta proteína para obtener los productos de reacción observados de forma experimental.

5.2. PUBLICACIÓN

BIOCHEMISTRY

including biophysical chemistry & molecular biology

RAPID REPORT

pubs.acs.org/biochemistry

High-Resolution Crystal Structure of MltE, an Outer Membrane-Anchored Endolytic Peptidoglycan Lytic Transglycosylase from *Escherichia coli*Cecilia Artola-Recolons,[†] César Carrasco-López,[†] Leticia I. Llarrull,[‡] Malika Kumarasiri,[‡] Elena Lastochkin,[‡] Iñaki Martínez de Ilarduya,[§] Kathrin Meindl,[§] Isabel Usón,[§] Shahriar Mobashery,[‡] and Juan A. Hermoso^{*,†}[†]Department of Crystallography and Structural Biology, Instituto de Química-Física "Rocasolano", CSIC, Serrano 119, 28006 Madrid, Spain[‡]Department of Chemistry and Biochemistry, University of Notre Dame, Nieuwland Hall of Science, Notre Dame, Indiana 46556, United States[§]Instituto de Biología Molecular de Barcelona, CSIC, Baldiri Reixach 13, 08028 barcelona, Spain, and ICREA (Institutio Catalana de Recerca y Estudis Avançats)

S Supporting Information

ABSTRACT: The crystal structure of the first endolytic peptidoglycan lytic transglycosylase MltE from *Escherichia coli* is reported here. The degradative activity of this enzyme initiates the process of cell wall recycling, which is an integral event in the existence of bacteria. The structure sheds light on how MltE recognizes its substrate, the cell wall peptidoglycan. It also explains the ability of this endolytic enzyme to cleave in the middle of the peptidoglycan chains. Furthermore, the structure reveals how the enzyme is sequestered on the inner leaflet of the outer membrane.

The cell wall is recycled during the course of the normal doubling of bacterial cultures as well as in response to damage, which might be inflicted by antibiotics.^{1,2} The major component of the cell wall is the peptidoglycan (PG), the neighboring strands of which undergo cross-linking for assembly of the functional cell wall. PG is comprised of alternating β -1,4-linked *N*-acetylmuramic acid (MurNAc) and *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) residues. A unique peptide stem, the site of cross-linking, is appended to lactyl groups of the MurNAc residues.¹ The reaction of lytic transglycosylases (LTs) is unusual in that the β -1,4-glycosidic bond between MurNAc and GlcNAc of PG is cleaved in an initial step that is believed to go through an oxocarbenium species, which in turn entraps the C6-hydroxyl moiety of MurNAc. This substrate-assisted catalysis leads to the formation of metabolite 1 (GlcNAc-anhMurNAc-1-Ala-D-Glu-m-Dap-D-Ala-D-Ala), which produces a nonreducing 1,6-anhydromuramyl residue. Metabolite 1 is taken up by the permease AmpG,³ and once in the cytoplasm, it undergoes a series of reactions that ultimately lead to the formation of lipid II, which is translocated to the surface of the bacterium for de novo synthesis of PG. Of the seven known *Escherichia coli* LTs, six are anchored to the outer membrane (MltA–MltF) and one is soluble (Slt70).⁴ A comparison of genes encoding LTs allowed their classification into four families.⁵ LT family 1 includes Slt70 and MltC–MltF, whereas MltA and MltB represent families 2 and 3, respectively.^{6,7} Most LTs appear to act as exolytic enzymes, releasing metabolite 1 from the ends of the glycan strands. The only exception in *E. coli* would appear to be MltE, which is proposed to be an endolytic enzyme. This is the ability

to fragment the peptidoglycan strand in the middle, which ultimately would lead to the formation of 1 by the action of other LTs on products of the reaction of MltE.⁸ Structural research on LTs has so far resulted in the X-ray structures of the 70 kDa soluble Slt70,⁹ the 36 kDa soluble Slt35 of *E. coli*,^{7,10} and the 38 kDa MltA.^{6,11,12} The Slt70 structure is built up of three distinct domains (U, L, and C domains), which are all rich in α -helices. The N-terminal domain is packed in a U-shaped conformation and connected to an L domain forming a closed ring with a large central opening.¹¹ The C-terminal domain is the catalytic one and is packed on top of this ring, interacting with both L and U domains. This C domain has a globular structure as the goose-type lysozyme.¹¹ Structural studies of Slt70 with peptidoglycan fragments⁹ revealed the presence of six saccharide binding sites in the active site groove. Slt35 is a fully active, soluble form of the 40 kDa membrane-anchored MltB. The structure of Slt35 of LT family 3 shows three domains named the α , β , and catalytic domains.⁷ The catalytic domain contains Glu162, which coincides with the catalytic Glu478 of Slt70 and Glu73 of goose-type lysozyme after superposition. Both Slt35 and Slt70 are exomuramidases that require the peptide side chains in peptidoglycan for activity.^{13,14} It is believed that the N-terminal, doughnut-shaped domain of Slt70 together with the presence of a specific binding site for 1,6-anhydromuropeptide product and the "exo loop" of Slt35 (residues 99–108) impose this exomuramidase activity.^{7,15} MltA (LT family 2), whose crystal structures from *E. coli* and *Neisseria gonorrhoeae* have been reported,^{11,12} presents a catalytic domain completely different from that of lysozyme.¹⁶ For LT family 1, only the three-dimensional structure of soluble exolytic Slt70 has been reported. We report here the first high-resolution (2.0 Å) crystal structure for the endolytic MltE.

Multisolution phasing through a search of small fragments derived from the catalytic module of Slt70¹⁵ combined with density modification was successfully applied using ARCIM-BOLDO.¹⁷ Two monomers were built in the asymmetric unit [root-mean-square deviation (rmsd) of 0.19 Å for all C α atoms], and refined to 2.0 Å resolution. MltE has a globular structure with 10 α -helices (Figure 1A). Its overall fold is similar to that of goose-type lysozyme. Utilizing the Dali server,¹⁸ the closest

Received: January 19, 2011

Revised: February 21, 2011

Published: February 22, 2011

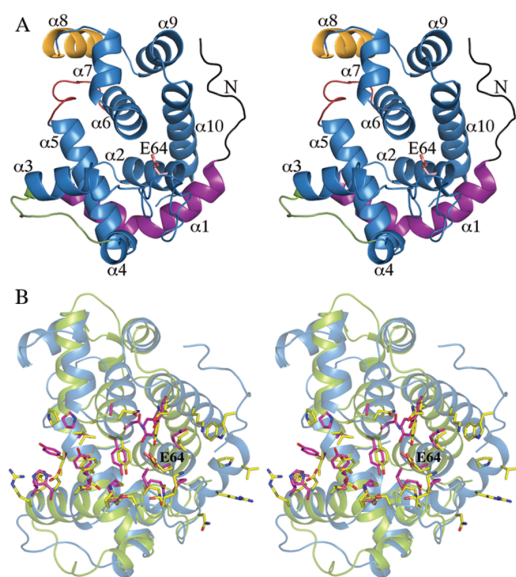


Figure 1. (A) Three-dimensional structure of MltE. The main structural differences with Slt70 are colored black (N loop), magenta ($\alpha 1$ helix), red (the loop connecting $\alpha 5$ and $\alpha 6$), and yellow ($\alpha 8$). The catalytic Glu64 is labeled. (B) Structural superimposition of MltE (blue ribbons) and the catalytic domain of Slt70 (green ribbons). Side chains building active sites are represented as sticks (yellow for MltE and pink for Slt70).

structural models of MltE are the catalytic module of Slt70¹⁵ [rmsd of 3.1 Å for 161 C α atoms (see Figure S1A of the Supporting Information)], the G-type lysozyme¹⁹ (rmsd of 2.6 Å for 144 C α atoms), and the Slt35 lytic transglycosylase⁷ (rmsd of 2.5 Å for 127 C α atoms). Despite the overall structural homology, significant differences exist between MltE and the catalytic domain of Slt70 (Figure 1B and Figure S1 of the Supporting Information). This is relevant as a high degree of sequence homology is observed in Slt70s¹⁵ and MltEs (Figure S1C of the Supporting Information). Among structural differences, three of them are critical for explaining specific features in MltE: the presence of an N-terminal loop (residues 19–30) and the long $\alpha 1$ helix (residues 30–50) that is markedly longer than the corresponding helix in Slt70 and the presence in MltE of a new α -helix ($\alpha 8$) presenting a basic patch of surface on one side of the protein (Arg161, Lys162, Lys163, and Lys167). While the first two differences are important for the endolytic character of MltE, the orientation of the N-terminal region and the new $\alpha 8$ have implications for interactions with the outer membrane by MltE (see below). As revealed in the MltE crystal structure, the long N-terminal loop (residues 19–30), not present in the Slt70 structure, is strongly stabilized through interactions with the core of the protein (see Table S2 of the Supporting Information) and provides a rigid scaffolding that connects the point of membrane anchoring [acylated Cys15, discussed below (Figure 2)] with the active site. In fact, Trp27, a residue within the N-terminal loop, is part of the active site (Figure 1B and Figure S2 of the Supporting Information). As indicated earlier, MltE is the only LT of *E. coli* with peptidoglycan endolytic activity. As such, the structure reveals it to have an extended active site that binds at least eight saccharides of the peptidoglycan chain (vide infra) as obtained by

molecular dynamics (MD) simulations. The substrate-binding cleft of lysozymes and other glycosylhydrolases accommodate several saccharide units at subsites designated as positions $-i$ (the nonreducing end) through $+j$ (in the other direction). The saccharide units flanking the scissile glycosidic bond are designated as positions -1 and $+1$. The ellipsoid shape of MltE with its two lobes is linked by long helix $\alpha 5$. The active site is sequestered in a deep groove that spans the two lobes within the -4 to $+4$ saccharide-binding subsites (Figure 2) versus the -4 to $+2$ saccharide-binding subsites reported for Slt70.⁹ The peptide-binding site at position -1 is formed by a shallow groove between $\alpha 7$ and the loop connecting $\alpha 9$ and $\alpha 10$ (Supporting Information), similar to what is found for Slt70.¹⁵ The site at position -3 is formed by the groove between $\alpha 3$ and $\alpha 5$. Another point of distinction concerns helix $\alpha 1$. This helix (residues 30–50) is longer (20 residues) than the corresponding helix in Slt70 (8 residues) and provides an extension of the substrate-binding site up to subsite $+4$. In addition, the loop connecting $\alpha 5$ with $\alpha 6$ creates a groove rich in acidic amino acids at the backside of the substrate-binding site (Figure 1A and Figure S3 of the Supporting Information) whose function is likely glycan stabilization of neighboring cross-linked PG strands. The last significantly distinct feature is the presence of an additional α -helix ($\alpha 8$). This helix comprises a cluster of basic residues (Figure 2) that forms, together with Arg182 (from $\alpha 9$) and Lys19 (from the N-terminal loop), a membrane-interacting surface near the acylated Cys15 (Figure 2A).

Glu64 is the catalytic residue at subsite -1 based on its equivalence in position to the catalytic glutamic acid in Slt70 (Figure 1B). The acidic form of Glu64 protonates the glycosidic oxygen that departs from the scissile bond in the substrate to give rise to the intermediary oxocarbenium ion. The now-deprotonated Glu64 would promote the C6-hydroxyl in the formation of the 1,6-anhydromuramyl moiety of the product.¹⁶ The three-dimensional structure of MltE and MD simulations reveals key insights into its unique endolytic activity, beyond the aforementioned expansive active site that spans subsites -4 to $+4$ for binding to the polymeric substrate. The active site surface accommodates the 3-fold symmetric right-handed helical structure of the peptidoglycan, as determined previously by NMR²⁰ (Figure S3 of the Supporting Information). It has binding sites for the extended peptide stems that would be appended to the MurNac moieties, in agreement with the peptide stem requirement for the activity of some LTs.¹⁵ The sites could accommodate the peptides regardless of whether they are cross-linked to a neighboring peptidoglycan. Potential steric encumbrance by such cross-linking would not appear to make a difference. This, in large measure, is likely due to MltE being the only single-domain LT in *E. coli*. The second step reaction of the enzyme, which leads to the formation of the 1,6-anhydroMurNac bicyclo ring, leads to the switch of all substituents from the equatorial to the axial positions. The conformational influence of this switch is profound, but especially so as far as the peptide moiety is concerned. It has been suggested that the Slt70 active site actually has a surface for binding of the peptide in the 1,6-anhydroMurNac at subsite $+2$, but a corresponding peptide-binding site is not seen in the structure of MltE (Figures S4 and S5 of the Supporting Information). This subsite in Slt70 has been postulated as being essential for directing product 1 from subsite -1 to subsite $+2$ after one turnover event, which allows processivity in the function of the exolytic enzymes such as Slt70¹⁵ (Figure S6 of the Supporting Information). The absence of this subsite in MltE abrogates this opportunity,

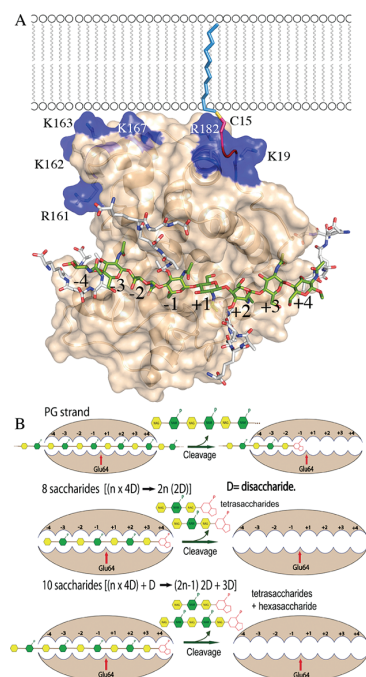


Figure 2. (A) MltE could accommodate saccharides at sites -4 to $+4$ (and also the associated peptides attached to the MurNAc moieties), consistent with the solution NMR structure for the peptidoglycan (shown in capped sticks). Docked saccharide rings and peptide stems from PG are colored differently (carbon atoms colored green for saccharides and white for peptides). N-Lipidated Cys15, the membrane anchor, is shown as a red coil. Some residues within the basic patch are labeled. (B) Scheme showing the proposed mechanism for endotransglycosylase MltE. Because MltE has eight sugar-binding sites and there are no other structural domains, MltE can cleave in the middle of the polymeric substrate. Four disaccharides (4D) fill the active site and undergo cleavage. For strands having $n \times 4D$ saccharides, the final products will be tetrasaccharides. For substrates having $n \times 4D + D$ saccharides (as a polysaccharide with 10 monosaccharide units), the final products will be $2n - 1$ tetrasaccharides plus one hexasaccharide. This scheme is consistent with the experimental observations.⁸

whereas the presence of eight saccharide-binding subsites supports the reported catalytic outcome for tetra- and hexasaccharide 1,6-anhydroMurNAc variants of the peptidoglycan as products (Figure 2B). In this vein, activity assays indicated that the tetrasaccharide analogue is not a substrate for MltE (data not shown).

Removal of the signal peptide in MltE by signal peptidase is followed by N-acylation of Cys15 by a fatty acid.⁸ The lipid penetrates the inner leaflet of the outer membrane. Whereas the contribution to anchoring by this lipid penetration might be quite significant, the structure of MltE suggests that an electropositive surface near the N-terminus might actually provide the draw to the membrane headgroups and also could contribute to substrate orientation during *in vivo* catalysis. A cluster of positively charged residues is located on this electropositive surface (Figure 2 and Figure S3 of the Supporting Information). The presence of basic patches has been associated with membrane sensing and binding in BAR domains.²¹ The relevance of this finding in the catalytic mechanism of LTs awaits additional structural information about other enzymes.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information. Experimental procedures for structural determination and molecular dynamics calculations. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

Accession Codes

The crystallographic coordinates are deposited in the Protein Data Bank as entry 2y8p.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Phone: (+34) 915619400. Fax: (+34) 915642431. E-mail: xjuan@iqfr.csic.es.

Funding Sources

This work was supported by Grants bfu2008-01711 and eu-cp223111. The work at the University of Notre Dame was supported by the National Institutes of Health. L.I.L. is a Pew Latin American Fellow in the Biomedical Sciences, supported by The Pew Charitable Trusts. K.M. acknowledges the Deutsche Forschungsgemeinschaft DFG.

■ REFERENCES

- (1) Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P., and Foster, S. (2008) *FEMS Microbiol. Rev.* 32, 259–286.
- (2) Suvorov, M., Fisher, J. F., and Mobashery, S. (2008) *Pract. Handb. Microbiol.*, 153–183.
- (3) Cheng, Q., and Park, J. T. (2002) *J. Bacteriol.* 184, 6434–6436.
- (4) Scheurwater, E., Reid, C. W., and Clarke, A. J. (2008) *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 40, 586–591.
- (5) Blackburn, N. T., and Clarke, A. J. (2001) *J. Mol. Evol.* 52, 78–84.
- (6) van Straaten, K. E., Barends, T. R., Dijkstra, B. W., and Thunnissen, A. M. (2007) *J. Biol. Chem.* 282, 21197–21205.
- (7) van Asselt, E. J., Dijkstra, A. J., Kalk, K. H., Takacs, B., Keck, W., and Dijkstra, B. W. (1999) *Structure* 7, 1167–1180.
- (8) Kraft, A. R., Templin, M. F., and Holtje, J. V. (1998) *J. Bacteriol.* 180, 3441–3447.
- (9) Thunnissen, A.-M. W. H., Dijkstra, A. J., Kalk, K. H., Rozeboom, H. J., Engel, H., Keck, W., and Dijkstra, B. W. (1994) *Nature* 367, 750–753.
- (10) van Asselt, E. J., Perrakis, A., Kalk, K. H., Lamzin, V. S., and Dijkstra, B. W. (1998) *Acta Crystallogr. D* 54, 58–73.
- (11) van Straaten, K. E., Dijkstra, B. W., Vollmer, W., and Thunnissen, A. M. (2005) *J. Mol. Biol.* 352, 1068–1080.
- (12) Powell, A. J., Liu, Z. J., Nicholas, R. A., and Davies, C. (2006) *J. Mol. Biol.* 359, 122–136.
- (13) Beachey, E. H., Keck, W., de-Pedro, M. A., and Schwarz, U. (1981) *Eur. J. Biochem.* 116, 355–358.
- (14) Romeis, T., Vollmer, W., and Hölte, J.-V. (1993) *FEMS Microbiol. Lett.* 111, 141–146.
- (15) van Asselt, E. J., Thunnissen, A. M., and Dijkstra, B. W. (1999) *J. Mol. Biol.* 291, 877–898.
- (16) Thunnissen, A. M., Rozeboom, H. J., Kalk, K. H., and Dijkstra, B. W. (1995) *Biochemistry* 34, 12729–12737.
- (17) Rodríguez, D. D., Grosse, C., Himmel, S., González, C., M de Ilarduya, I., Becker, S., Sheldrick, G. M., and Usón, I. (2009) *Nat. Methods* 6, 651–654.
- (18) Holm, L., and Rosenström, P. (2010) *Nucleic Acids Res.* 38, 545–549.
- (19) Helland, R., Larsen, R. L., Finstad, S., Kyomuhendo, P., and Larsen, A. N. (2009) *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 2585–2598.
- (20) Meroueh, S. O., Bencze, K. Z., Heseck, D., Lee, M., Fisher, J. F., Stemmler, T. L., and Mobashery, S. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 4404–4409.
- (21) Reider, A., Barker, S. L., Mishra, S. K., Im, Y. J., Maldonado-Baez, L., Hurley, J. H., Traub, L. M., and Wendland, B. (2009) *EMBO J.* 28, 3103–3116.

5.3. INFORMACIÓN ADICIONAL

SUPPORTING INFORMATION:

Experimental Procedures

Cloning of the gene for MltE, expression of the protein and its purification to homogeneity and crystallization of MltE (amino acids 18-203), which excluded the sequence for the signal peptide and the membrane anchoring amino acid, have been reported (1).

Data collection and processing. Two X-ray diffraction data sets were collected using synchrotron radiation source at the ESRF (Grenoble, France) on ID23-2 with the use of a CCD detector and fixed wavelength of 0.8726. Collected images were indexed, integrated and scaled using XDS, IMOSFLM and SCALA (Collaborative Computational Project, 1994). Both data sets were scaled and merged together with XPREP (2). Native MltE crystals belonged to the orthorhombic space group C222₁ with cell dimensions of $a = 123.32 \text{ \AA}$, $b = 183.93 \text{ \AA}$, $c = 35.29 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$, and 2 molecules in the asymmetric unit.

Structure solution and refinement. Considering the significant (35%) sequence identity between MltE and the catalytic module of Slt70, for which the X-ray structure is known, molecular replacement was tried to solve the structure. However all the programs failed in providing a viable solution. The structure was solved with the program ARCIMBOLDO (3), on a large number of alternative fragments derived from random trimming of PDB entries containing partial structures with the highest sequence similarity. The successful attempt was part of a pool of trials with polyalanine fragments made up of 114 residues cut from entry 1QTE (4). This structure displays a 35% identity over a span of 66 residues to MltE but could not be successfully used within a conventional molecular replacement approach. The model with the best Z-score for the translation function, as evaluated by PHASER (5), for a partial solution made up of two fragments was subjected to further trimming by iterative peaklist optimization (6) on a residue basis against the E-based correlation coefficient. The correlation coefficient increased from 8.0 to 10.9. Whereas the untrimmed solution could not be successfully expanded with SHELXE (7), the remaining model, containing 85 amino acids per monomer, rendered a mainchain trace of 247 amino acids, characterized by a correlation coefficient of 36.1%. Ten cycles of mainchain tracing interspersed with density modification were carried out.

The model obtained from ARCIMBOLDO was subjected to successive refinement cycles using PHENIX (8), and manual model building was performed using the graphics program COOT (9). Excellent density maps were obtained. Finally, the addition of water molecules improved the R_{work} and R_{free} to 20.3 and 25.2 respectively. All of the amino-acid residues in the structure fitted perfectly in the Ramachandran plot.

Computational Analyses. The X-ray coordinates for the protein atoms were used. The coordinates of the peptidoglycan substrate were from the NMR solution structure reported recently (10). These coordinates were used to construct an octasaccharide of alternating MurNAc and GlcNAc sugars, which was docked on to the crystal structure using the ChemScore (11) scoring function of the GOLD (12) docking program. The substrate glycosidic oxygen that experiences protonation by Glu64 in the course of turnover chemistry was restrained to the vicinity of the carboxylic acid of Glu64. The stem peptides, D-Ala-D-Ala-*m*-DAP- γ -D-Glu-L-Ala, were added to MurNAc sugars. The peptides in this complex were allowed to undergo energy minimization, while the rest of the atoms were restrained. For molecular dynamic simulations, ligand and acidic Glu64 charges were obtained utilizing the RESP methodology. Amber ff99, gaff and glycam04 force-fields provided the simulation parameters. The system was solvated with TIP3P (13) water molecules in a truncated octahedral periodic box.

Molecular dynamics simulations were carried out using the Amber 10 package (14). During simulations, temperature and pressure controls were achieved by the Langevin and isotropic position scaling methods respectively. Following an extensive equilibration phase, data were collected along a 2 ns trajectory. Average system temperature, pressure and energy along the 2-ns trajectory were constant indicating that the trajectory had reached a stable phase. Finally, an

TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN

averaged structure was generated from all the snapshots of the final 500 ps and this structure was subjected to a 50,000 steps conjugated-gradient energy minimization.

Table S1. Crystallographic data. Data collection and refinement statistics.

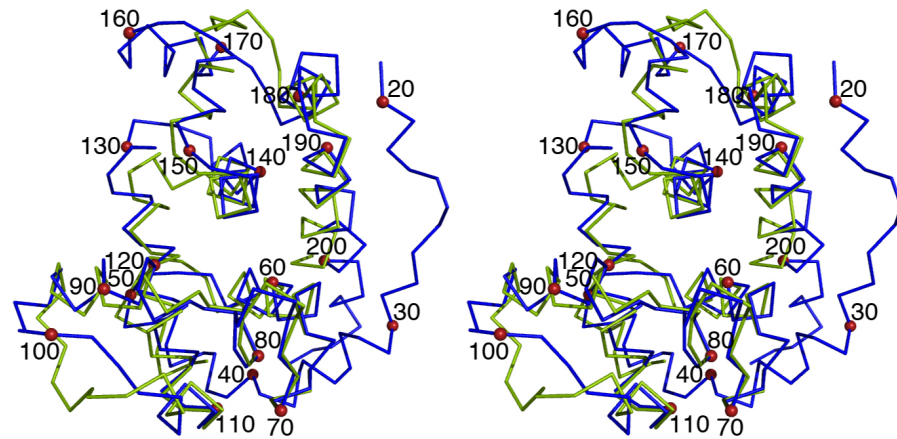
Data Collection			
	Data Set 1	Data Set 2	Merged
Space Group		C 2 2 2 ₁ .	
Cell Dimensions			
a, b, c (Å)		123.32, 183.93, 35.29	
α, β, γ (deg)		90.0, 90.0, 90.0	
Resolution (Å)	40.1-2.0	19.3-2.0	40.1-2.0
R_{merge} (%) ^a	6.6 (34.9)	6.0 (35.4)	6.2 (30.0)
$I/\sigma I$ ^a	12.1 (3.0)	12.1 (3.0)	12.9 (3.6)
Completeness (%) ^a	72.5 (47.8)	99.5 (97.6)	99.6 (97.6)
Refinement			
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$			0.20/0.25
No. atoms			
Protein			2915
Water			250
rms deviations			
Bond length			0.007
Bond angle (deg)			1.048
B factor (Å ²)			
Protein			22.82
Water			29.07

^a Highest resolution shell of 2.1-2.0 Å is shown in parentheses.

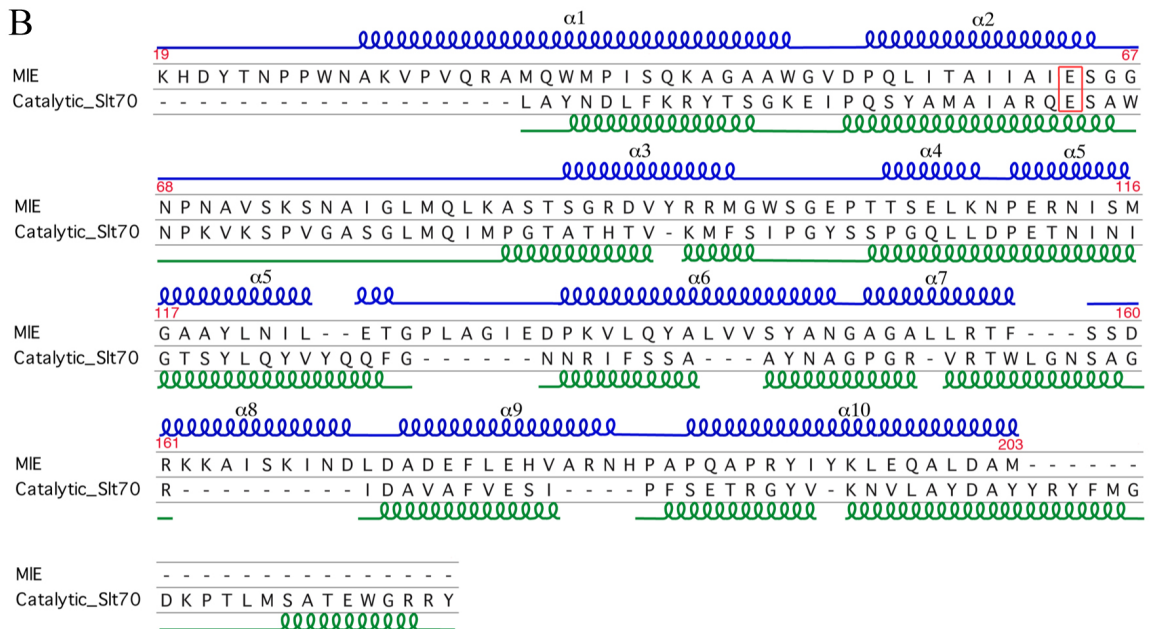
Table S2. Interactions between N-terminal Loop (residues 19-30) and $\alpha 10$ helix.

INTERACTIONS OF N-terminal LOOP with $\alpha 10$			
N-loop	$\alpha 10$	Type of interaction	Distance (Å)
His (20)	Ala (181)	Hydrogen bond	3.32
Tyr (22)	Leu (177)	Hydrophobic	4.07
	Arg (191)	Hydrogen bond	3.08
Asn (24)	Arg (191)	Hydrogen bond	3.5
Pro (25)	Arg (191)	Hydrogen bond	2.91
Trp (27)	Tyr (194)	Hydrogen bond	2.91
	Lys (195)	Cation- π	3.63
	Gln (198)	Hydrogen bond	2.88

A



B



C

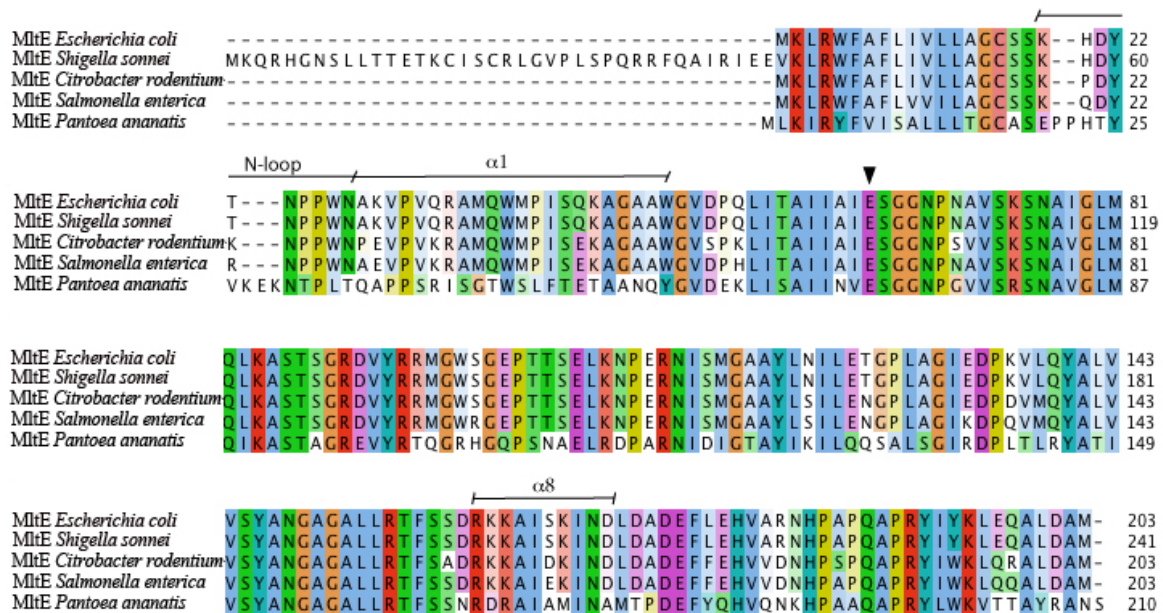


Figure S1. (A) Stereo view showing superimposition of the main-chain tracing of the crystal structure of membrane-bound endolytic transglycosylase MltE (blue) and the catalytic domain of soluble exolytic transglycosylase Slt70 (green). Residue numbers in MltE are labeled every ten positions. (B) Sequence and Secondary structure comparison between MltE and the catalytic domain of Slt70. The most prominent differences between both enzymes are the presence in MltE of a N-terminal loop (residues 19-30), the long $\alpha 1$ helix (residues 30-50) that is markedly longer than the corresponding helix in Slt70 (20 vs. 8 residues, respectively) and the presence in MltE of a new α helix ($\alpha 8$) presenting a basic patch inside (Arg161, Lys162, Lys163, Lys167). While the first two differences are related with the endolytic character of MltE, the third one is related with membrane binding in MltE. (C) Sequence Multiple sequence alignment of MltE sequences from *Escherichia coli*, *Shigella sonnei* (99% overall identity), *Citrobacter rodentium* (89% overall identity), *Salmonella enterica* (91% overall identity) and *Pantoea ananatis* (52% overall identity). Some structural features found in *E. coli* MltE structure are labeled. Catalytic Glu64 is indicated with a black arrow.

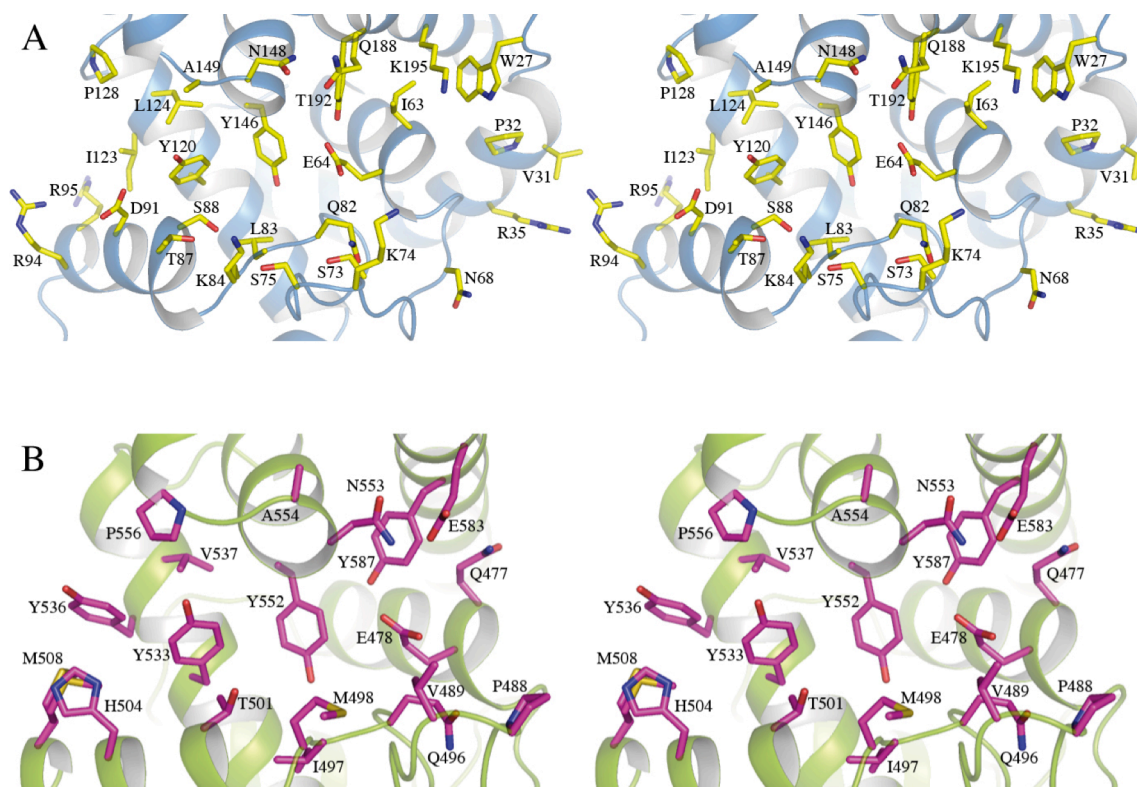


Figure S2. Stereo view of MltE and Slt70 active sites. (A) active site of MltE. 3D structure is drawn as a ribbon diagram (colored in blue) and with the side-chains forming the active site represented as capped sticks (carbon atoms in yellow). The catalytic residue (Glu64) is in groove with four aromatic residues (Trp27, Tyr120 Tyr146 and Tyr192) that together with Pro32 and Pro128 and hydrophobic residues (Val31, Leu83, Ile63, Ile123 and Leu124) make up the floor of the active site for binding of the saccharide rings from the substrate. Polar residues (Arg35, Arg44, Gln68, Ser73, Ser75, Gln82, Lys84, Thr87, Ser88, Asp91, Arg94, Arg95, Gln148, Gln188 and Lys195) could further stabilize the substrate by H-bonds interactions. (B) Active site of Slt70. 3D structure is drawn as a ribbon diagram (colored in green) and with the side-chains forming the active site represented as capped sticks (carbon atoms in pink).

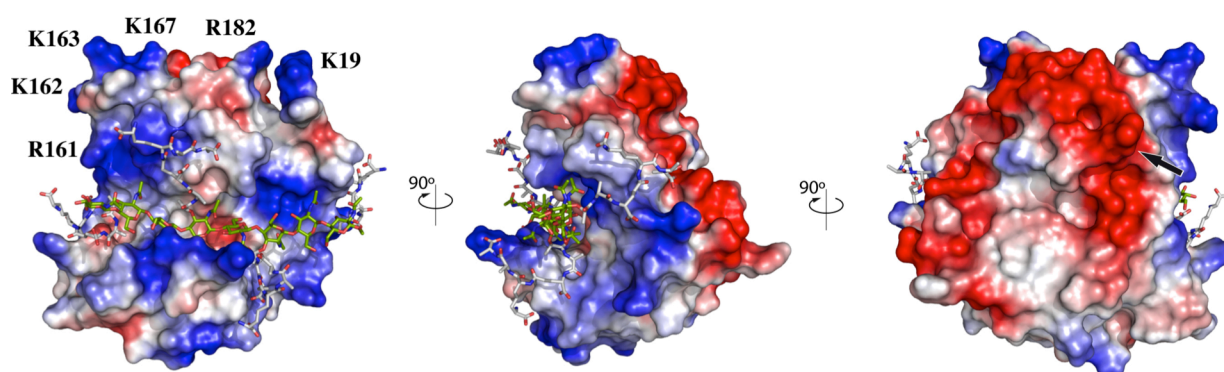


Figure S3. Electrostatic potential on the molecular surface of MltE. The docked NMR structure of the PG is drawn as capped sticks and colored as in Figure 2. Electropositive surface is colored in blue and electronegative in red. Some residues of the basic patch are labeled. Acidic loop connecting $\alpha 5$ with $\alpha 6$ is indicated with an arrow.

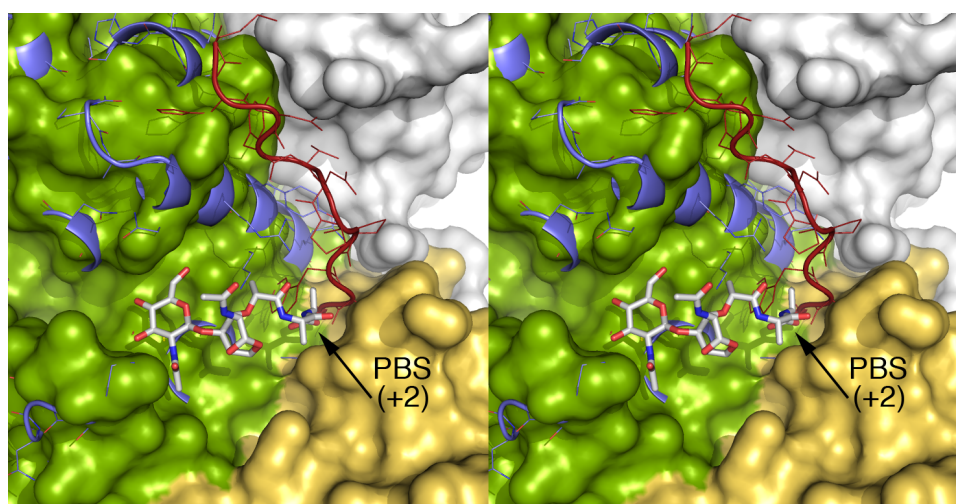


Figure S4. Stereo view of MltE superimposed to the Slt70:1,6-anhydromuramyl metabolite **1** complex. MltE is drawn as a ribbon diagram (colored in blue and red) and with the side-chains represented as thin sticks. Active site of Slt70 representing the molecular surface with each domain colored differently (catalytic in green, linker domain in yellow and U-domain in white). The product **1** is represented as capped sticks, with atoms colored by atom types (nitrogen, blue; oxygen, red, and carbon, gray). In Slt70 there is a peptide-binding site for the reaction product at site +2 (labeled as PBS (+2) in the figure). Despite the active sites of both enzymes being similar, the N-terminal loop (residues 19-30, colored in red) in MltE prevents peptide-stem recognition for the product at site +2.

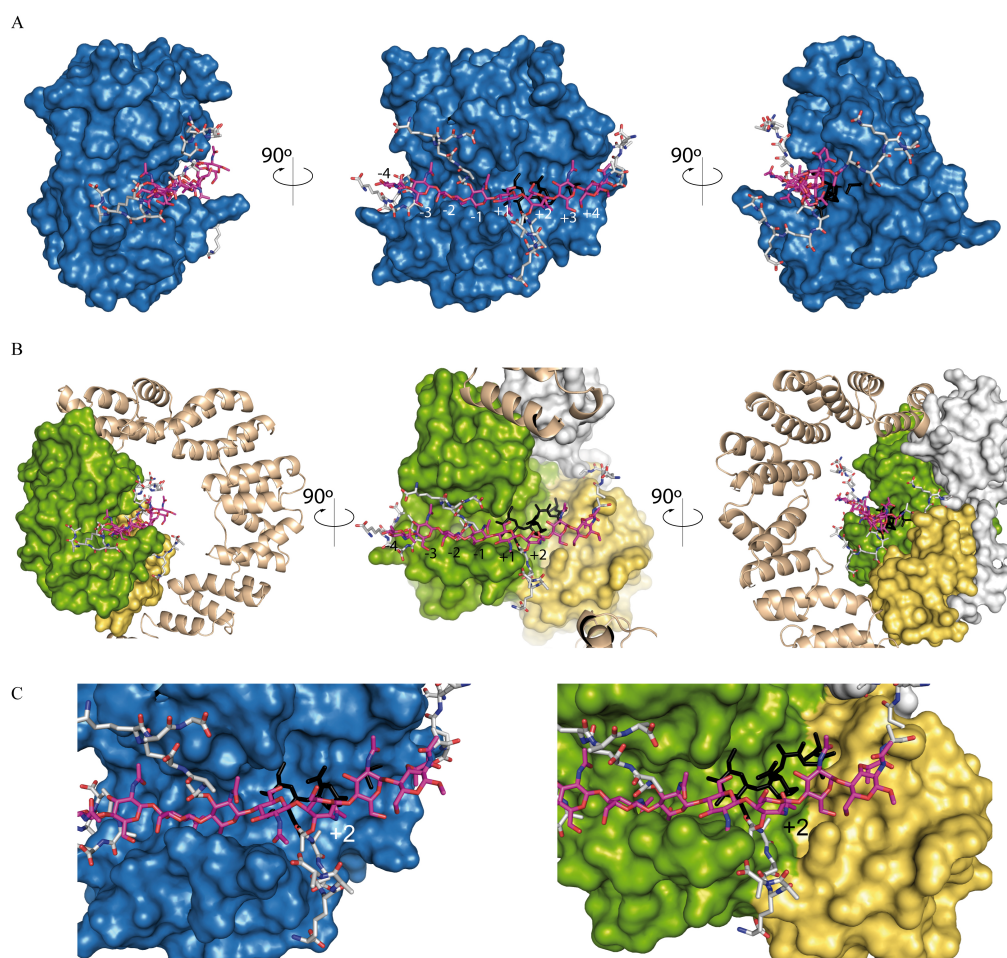


Figure S5. (A) Computational model of MltE:PG octamer complex. Three views showing the molecular surface of MltE (colored in blue) and the PG octamer (capped sticks). Saccharide rings and peptide-stems from PG are colored differently (carbon atoms in pink for saccharides and in white for peptides). The active-site surface of MltE accommodates the three-fold symmetric right-handed helical structure of the peptidoglycan, as determined by NMR (Meroueh, et al. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2006**, *103*, 4404). The 1,6-anhydromuramyl metabolite **1** (black sticks) observed in the Slt70: 1,6-anhydromuramyl metabolite **1** complex is depicted in the MltE active site for comparison purposes. Substrate-binding subsites for MltE are labeled. (B) Three views showing the molecular surface of Slt70:1,6-anhydromuramyl metabolite **1** complex with each domain colored differently (catalytic in green, L-domain in yellow and U-domain in white). For clarity reasons, part of the U domain not involved in PG interaction, is represented as brown cartoon. The reaction product 1,6-anhydromuramyl metabolite **1** is depicted as black sticks. The PG octamer obtained in the computational model of MltE:PG octamer complex is superimposed for comparison purposes. Substrate-binding subsites for Slt70 are labeled. (C) Detail of active sites of MltE and Slt70 represented as in previous panels. As observed, both MltE and Slt70 present a similar site for substrate recognition but the peptide-binding site for the reaction product at subsite +2 found in Slt70 is not present in MltE.

Slt 70

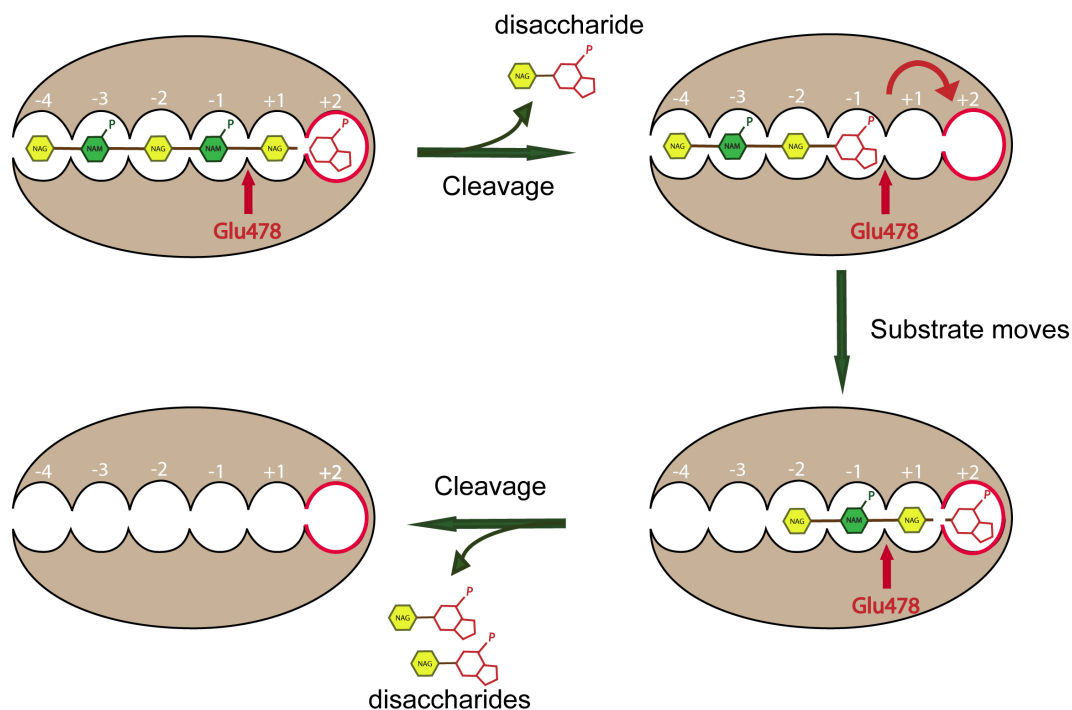


Figure S6. Scheme showing the processive mechanism for exo-transglycosylase Slt70 (after van Asselt, E. J.; Thunnissen, A. M.; Dijkstra, B. W. In *J Mol Biol* 1999; Vol. 291, p 877). In *E. coli* peptidoglycan, all glycan strands are believed to start with a GlcNAc residue and end with an anhMurNAc residue. Slt70 binds the peptidoglycan with the anhMurNAc end in site +2. Since Slt70 has six sugar-binding subsites, a GlcNAc residue would be bound in site -4, and additional residues connected to this GlcNAc would remain in the milieu. After completion of the lytic transglycosylase reaction, the strand with the newly formed anhMurNAc moves up from site -1 to site +2, thereby replacing the previously formed 1,6-anhydromuropeptide product, and it is ready to undergo the next cleavage cycle by the enzyme. Movement of the glycan strand further than site +2 is restricted because of the steric obstruction imposed by the other structural domains presents in Slt70. The end product is compound **1**.

References:

1. Artola-Recolons, C.; Llarrull, L.I.; Lastochkin, E.; Mobashery, S.; Hermoso, J.A., *Acta Cryst. F.* 2011, F67, 161-163.
2. Sheldrick, G. M., *Acta Crystallogr. A.* 2008, 64, 112-122.
3. Rodríguez, D.D., Grosse, C., Himmel, S., González, C., M de Ilarduya, I., Becker, S., Sheldrick, GM & Usón, I. *Nature Meth*, 2009, 6, 651-654.
4. Van Asselt E.J., Thunnissen A.-M.W.H., Dijkstra. B.W. *J. Mol. Biol.* 1999, 291, 877-898.
5. McCoy, A.J. Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C. and Read, R. J. *J. Appl. Crystallogr.* 2007, 40, 658-674.
6. Sheldrick G.M. and Gould R. O. *Acta Crystallogr. B.* 1995, 51, 423-431.
7. Sheldrick, G. M. *Z. Kristallogr.* 2002, 217, 644-650.
8. Adams, P. D.; Afonine, P. V.; Bunkóczi, G. V.; Chen, B.; Davis, I.W.; Echols, N.; Headd, J.J.; Hung, L.-W.; Kapral, G. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; McCoy, A. J.; Moriarty, N. W.; Oeffner, R.; Read, R. J.; Richardson, D. C.; Richardson, J. S.; Terwilliger T. C. and Zwart P. H. *Acta Cryst.* 2010, D66, 213-221.
9. Emsley, P.; Lohkamp, B.; Scott, W.G.; Cowtan, K. *Acta Cryst.* 2010, D66, 486-501.
10. Meroueh, S. O.; Bencze, K. Z.; Hesek, D.; Lee, M.; Fisher, J. F.; Stemmler, T. L.; Mobashery, S. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006, 103, 4404.
11. Eldridge, M.D.; Murray, C.W.; Auton, T.R.; Paolini, G.V.; Mee, R.P. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* 2007, 11, 425-445.
12. Jones, G.; Willett, P.; Glen, R.C.; Leach, A.R.; Taylor, R. *J. Mol. Biol.* 1997, 267, 727-748.
13. Jorgensen, W.L.; Chandrasekhar, J.; Madura, J.D.; Impey, R.W.; Klein, M.L. *J. Chem. Phys.* 1983, 79, 926-935.
14. Case, D.A.; Darden, T.A.; Cheatham, III, T.E.; Simmerling, C.L.; Wang, J.; Duke, R.E.; Luo, R.; Crowley, M.; Walker, R.C.; Zhang, W.; Merz, K.M.; Wang, B.; Hayik, S.; Roitberg, A.; Seabra, G.; Kolossváry, I.; Wong, K.F.; Paesani, F.; Vanicek, J.; Wu, X.; Brozell, S.R.; Steinbrecher, T.; Gohlke, H.; Yang, L.; Tan, C.; Mongan, J.; Hornak, V.; Cui, G.; Mathews, D.H.; Seetin, M.G.; Sagui, C.; Babin, V.; Kollman, P.A. *AMBER 10* 2008, University of California, San Francisco.

5.4. DISCUSIÓN.

La estructura de MltE se ha resuelto a 2.1 Å de resolución. MltE posee un plegamiento similar al módulo catalítico de la Stl70 y al de la lisozima de ganso. A pesar de este parecido, la MltE no pudo resolverse por Reemplazo Molecular. La estructura de MltE de *E. coli* se resolvió *de novo* utilizando el programa Arcimboldo.

A diferencia de la Stl70, MltE posee un extremo desestructurado en la zona N-terminal y una primera hélice bastante más larga que en Stl70, que queda muy estabilizada por el resto de la proteína. Además, MltE cuenta con una hélice adicional ($\alpha 8$) que forma una superficie básica, posiblemente para su interacción con la membrana cerca de la cisteína de acilación. Estos cambios estructurales determinan el anclaje de la proteína a la parte interna de la membrana externa, así como la orientación de la misma.

La estructura tridimensional de esta transglicosilasa lítica ha permitido proponer un mecanismo para explicar su actividad. La estructura cristalográfica revela que MltE posee un sitio activo capaz de unir hasta ocho azúcares de la cadena de peptidoglicano. Por comparación con el sitio activo de Stl70, que posee seis sitios de unión definidos desde -4 hasta +2, los ocho sitios de la MltE se han definido desde -4 hasta +4. MltE presenta el mayor número de sitios de unión al sustrato de todas las LTs determinadas hasta el momento. La estructura de MltE nos ha permitido postular un mecanismo de catálisis que explicaría los resultados obtenidos experimentalmente de que MltE produce básicamente productos tetra y hexasacáridos. Además, el hecho de tener un único dominio le permite estéricamente unir las cadenas de peptidoglicano por el centro, lo que explicaría su demostrada actividad primordialmente endolítica.

Estudios de dinámica molecular han corroborado el mecanismo propuesto para MltE. Estos experimentos han sugerido que MltE, además de unir ocho azúcares de la cadena principal de PG, puede acoplar los péptidos unidos a los NAM. La unión a sustratos de cadena libre o cruzada no interfiere, por tanto, en la actividad de MltE.

Las conclusiones fundamentales de este trabajo se resumen a continuación:

- Se ha resuelto la estructura cristalográfica de MltE, que presenta hasta 8 sitios de unión a azúcares en el sitio activo.
- Se ha desvelado cómo MltE está anclada a la parte interna de la membrana externa, limitando su actividad y determinando su orientación en la pared.
- Se ha propuesto un mecanismo de reacción para la actividad endolítica de MltE que explica los productos observados de forma experimental.

6. ARTÍCULO 3.

Reaction products and the X-ray structure of AmpDh2, a virulence determinant of *Pseudomonas aeruginosa*

Journal of the American Chemical Society (2013) 135, 10318–10321.

6.1. INTRODUCCIÓN A LA AMIDASA PERIPLÁSMICA AMPDH2 Y APORTACIÓN DEL AUTOR

El patógeno *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria Gram-negativa capaz de desarrollar múltiples resistencias a antibióticos. Este organismo es responsable de numerosas infecciones y ha hecho del proceso de reciclaje de PG su mecanismo de reparación contra los antibióticos β -lactámicos.

Los productos de las LTs son internalizados al citoplasma a través de la permeasa AmpG, donde actúan como sustrato de NagZ primero y AmpD después. AmpD es una amidasa citosólica común para todos los organismos Gram-negativos, que hidroliza el péptido. El producto de esta reacción es modificado químicamente por una serie de reacciones sucesivas hasta convertirse de nuevo en el Lípido II, que es externalizado hacia el periplasma y a partir del cual se construye la pared celular.

AmpD es una amidasa directamente implicada en la regulación de AmpC- β -lactamasas. La inactivación del gen *ampD* implica una hiperproducción de AmpC y en consecuencia a la resistencia a β -lactámicos en *Enterobacteriaceae*. Sin embargo, la regulación de AmpC es distinta en *P. aeruginosa*. Esta diferencia se debe a que *P. aeruginosa* posee tres genes parálogos para la proteasa AmpD: además de la citoplásmica AmpD, posee también AmpDh2 y AmpDh3, ambas periplásmicas. El mecanismo de resistencia a penicilinas para este organismo es sustancialmente distinto al resto de los organismos Gram-negativos, ya que la activación de AmpC necesita de una silenciación secuencial de los genes *ampD*, *ampDh2* y *ampDh3*. El sistema de represión y activación de AmpC desarrollado por *P. aeruginosa* es uno de los más sofisticados descritos hasta la fecha para un microorganismo (Juan *et al.*, 2006). La presencia de tres genes reguladores es claramente beneficioso para *P. aeruginosa*, permitiéndole adquirir niveles diferentes de producción de β -lactamasas.

A pesar de que no se conoce con exactitud el mecanismo de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*, es muy probable que los productos de reacción de AmpDh2 y AmpDh3 estén directamente implicados (Boudreau *et al.*, 2012).

AmpDh2 (28.8 KDa, 259 residuos) está situada en el periplasma y se encuentra anclada a la membrana. Su función es hidrolizar la parte peptídica de las cadenas de PG. El gen de *ampDh2* está localizado en el cromosoma de PA01 entre los genes regulatorios de alginato *kinB* (PA5484) y *algB* (PA5486). La relación entre el mecanismo regulatorio de *ampC* y otros procesos celulares es un tema de vital importancia actualmente (Juan *et al.*, 2006).

Análisis enzimológicos de esta proteína indicaron que, junto con AmpDh3, ambas amidasas son específicas para la ruptura del enlace peptídico del murámico de la cadena de PG, ayudando a la ruptura de la pared celular, tal y como era de esperar en enzimas periplásmicas (Zhang *et al.*, 2013).

En este trabajo se ha querido dar respuesta a varias cuestiones:

- Cómo AmpDh2 se une a la membrana externa de la pared celular
- Cuál es el modo de unión a la pared bacteriana
- Cuáles son las bases moleculares de su mecanismo catalítico

La autora de esta Tesis ha caracterizado la estructura tridimensional de AmpDh2, cristalizado y determinado la estructura de distintos complejos con análogos de la pared bacteriana. El análisis de las estructuras obtenidas ha permitido proponer un innovador mecanismo de reacción, en correlación con los resultados de los experimentos bioquímicos realizados en el laboratorio del Prof. Mobashery.

6.2. PUBLICACIÓN



Communication

pubs.acs.org/JACS

Reaction Products and the X-ray Structure of AmpDh2, a Virulence Determinant of *Pseudomonas aeruginosa*

Siseth Martínez-Caballero,^{†,§} Mijoon Lee,^{‡,§} Cecilia Artola-Recolons,^{†,§} César Carrasco-López,[†] Dusan Heseck,[‡] Edward Spink,[‡] Elena Lastochkin,[‡] Weilie Zhang,[‡] Lance M. Hellman,[‡] Bill Boggess,[‡] Shahriar Mobashery,^{*,‡} and Juan A. Hermoso^{*,†}

[†]Department of Crystallography and Structural Biology, Institute of Physical Chemistry "Rocasolano", CSIC, Serrano 119, 28006 Madrid, Spain

[‡]Department of Chemistry and Biochemistry, Nieuwland Science Hall, University of Notre Dame, Indiana 46556, United States

§ Supporting Information

ABSTRACT: The zinc protease AmpDh2 is a virulence determinant of *Pseudomonas aeruginosa*, a problematic human pathogen. The mechanism of how the protease manifests virulence is not known, but it is known that it turns over the bacterial cell wall. The reaction of AmpDh2 with the cell wall was investigated, and nine distinct turnover products were characterized by LC/MS/MS. The enzyme turns over both the cross-linked and noncross-linked cell wall. Three high-resolution X-ray structures, the apo enzyme and two complexes with turnover products, were solved. The X-ray structures show how the dimeric protein interacts with the inner leaflet of the bacterial outer membrane and that the two monomers provide a more expansive surface for recognition of the cell wall. This binding surface can accommodate the 3D solution structure of the cross-linked cell wall.

Bacterial cell wall is constituted primarily of the peptidoglycan, which has a backbone of repeating *N*-acetylglucosamine-*N*-acetylmuramic acid (NAG-NAM), with a peptide stem appended to the lactyl moiety of NAM.¹ Cross-linking of the spatially proximal peptide stems by the action of transpeptidases, generates the polymeric cell wall (also referred to as the sacculus), which encases the entire bacterium.² The synthesis, maturation, and recycling of cell wall take place in a dynamic manner throughout the life of the bacterium.³

Pseudomonas aeruginosa is a problematic human pathogen that has evolved a number of intricate mechanisms for processing its cell wall for the purpose of its recycling, a link to manifestation of antibiotic resistance and for virulence. The details of these events have not been fully elucidated.^{4,5} The genomic analyses of the organism have revealed it to possess three paralogous zinc proteases, referred to as AmpD, AmpDh2, and AmpDh3, with roles in turnover of cell wall and its metabolites.⁶ AmpD is the cytoplasmic protease at the crossroads of antibiotic resistance and cell-wall recycling. We revealed recently that AmpDh2 and AmpDh3 are periplasmic enzymes which turn over the cell wall.⁷ The reaction that these enzymes catalyze is hydrolysis of the amide bond between the lactyl moiety of muramyl or 1,6-anhydromuramyl moiety and the *N*-terminal L-Ala of the stem peptide (Figure 1).⁷

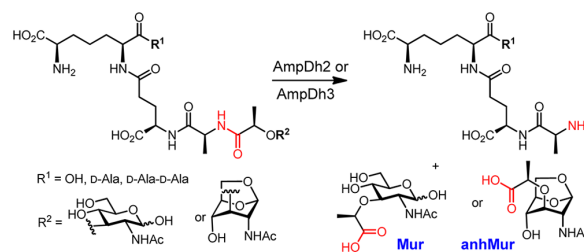


Figure 1. Hydrolytic reactions of AmpDh2 and AmpDh3.

A report by Oliver and colleagues on knockout strains of *P. aeruginosa* in an infection model in rodents disclosed that ablation of the genes *ampDh2* and *ampDh3* rendered the organism less virulent.⁸ The mechanism of this contribution to virulence is unknown but likely involves signaling by peptidoglycan-derived compounds.⁵ Elucidation of the nature of the products of the reactions of these enzymes with the sacculus and the structural factors governing interactions of the cell wall, and the virulence factors are at the forefront of understanding how *Pseudomonas* exists and how it infects.

We have reported the cloning of the gene and the purification of AmpDh2 to homogeneity.⁷ This protein has a 17-amino-acid *N*-terminal membrane anchor, which was eliminated in cloning. The purified recombinant protein is dimeric in solution by sedimentation velocity analysis (Supporting Information, SI), with an apparent molecular mass of $58\,000 \pm 5000$ Da. This determination is within the experimental error for the theoretical mass of the dimeric protein. Sedimentation equilibrium experiments were also run, and the data were best fit to a single-species model using the molecular weight of the AmpDh2 as a dimer. The X-ray structure of AmpDh2 is also of a dimer, which will be discussed later.

Overnight incubation of a preparation of *P. aeruginosa* sacculus from the stationary-phase culture and the homogeneously purified AmpDh2 gave a set of solubilized reaction products, but we had noted that the amount of these products was small.⁷ This indicates either that the major reaction

Received: May 31, 2013

Published: July 2, 2013

products remained associated with the polymeric and/or insoluble sacculus or that there is no more reaction to be detected. To explore these possibilities, we performed the reaction of AmpDh2 with the pseudomonal sacculus and subsequently further fragmented the sacculus by the reaction of the purified lytic transglycosylase MltA from *Escherichia coli*, an enzyme available in our laboratories.⁹ MltA shows a strong exolytic activity—lytic reaction from an end of the peptidoglycan. Each reaction liberates a {NAG-1,6-anhMur-(peptide)}_n unit (for example, **2**, **10** for $n = 1$; **7**, **8** for $n = 2$, and **9** for $n = 3$). The ensuing MltA-processed fragmentation of the sacculus would result in compounds that would be imprinted with the outcome of the reaction of AmpDh2 onto the polymeric and/or insoluble sacculus fraction. If there were no AmpDh2 reaction on the polymeric and/or insoluble sacculus, then merely the products of the MltA reactions would be detected. In the event of an AmpDh2 reaction, one would expect the removal of the peptide stem from the saccharide backbone of the peptidoglycan. The results of the sequential exposure of the sacculus to AmpDh2 and MltA are shown in Figure 2A for nine abundant products. Products were detected

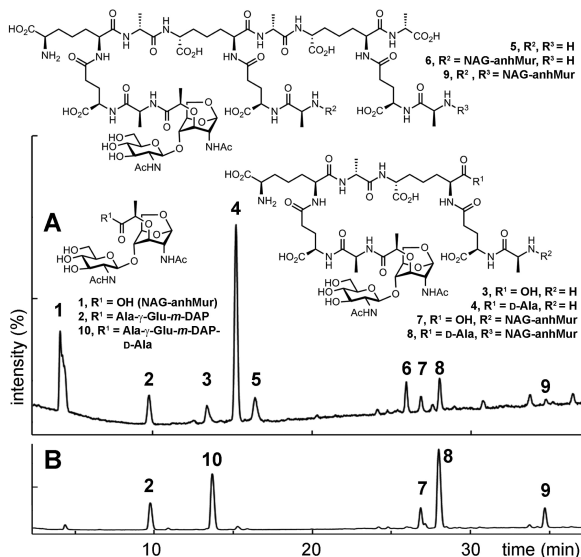


Figure 2. LC/MS total-ion chromatogram of the reaction of AmpDh2 followed by that of MltA with the sacculus (A) and of MltA alone as a control (B). The chemical structures of the abundant products are shown.

by LC/MS at the detection limit of low picomole, and the structures were assigned using LC/MS/MS. We note the telltale chemical imprint of the reaction of AmpDh2, namely proteolysis at the amide bond between the lactate and L-Ala of the stem peptide; one fully reacted (**1**) and others partially reacted products (**3–6**). These signals are not found in the chromatogram of the reaction of MltA alone with the sacculus (Figure 2B). Yet, we detect some unprocessed potential substrates for the AmpDh2 as well (**2**, and **7–9**); we attribute this last category to the lack of access to the sites by the dimeric AmpDh2 in the intact sacculus.

Interestingly, compound **4** exhibited an m/z value of 683.301²⁴, corresponding to the structure with the cross-linked peptide (octapeptide) with a single unit of NAG-1,6-anhMur

attached to one end. We performed an LC/MS/MS experiment to elucidate to which end the disaccharide was appended, giving a structure corresponding to **4** (Figures 2 and S7). This type of product is an example of a “partial” reaction by AmpDh2. This finding can be explained by either a preference by the enzyme for the acceptor site (shown as compound **4**), as opposed to the donor site of the cross-linked peptide, or that one site is more accessible to the enzyme in the intact sacculus. Products **3**, **5**, and **6** also fall into this partial-reaction category. The amounts of the individual products were quantified by integration of the peak areas of extracted ion chromatograms (EICs), and these amounts are given as percentages of the total in Table S3. Percentages of the product **1** and totals for the partial-reaction products and for unreacted sites were 40%, 49%, and 11%, respectively. The same reaction with log-phase sacculus gave a lesser quantity of products but a similar product distribution (Table S3).

To gain insight into the structural issues of AmpDh2 reactions, we crystallized the protein and determined a high-resolution X-ray structure of the apo enzyme. A synthetic substrate for AmpDh2, 1,6-anhMur-Ala- γ -D-Glu- m -DAP-D-Ala-D-Ala; DAP for diaminopimelate (Figure 1),^{7,10} was soaked with crystals. The crystals turned over this substrate to produce a complex of the enzyme with the peptide product (AmpDh2:5P complex), whose structure was solved (Table S1). The complex of AmpDh2 with a synthetic sample of NAM-NAG-NAM-NAG (AmpDh2:4S complex) was also solved (Table S1).

We see two monomers in the asymmetric unit related by a pseudo-two-fold axis that orients the two active sites to opposite sides (Figure 3A). Both monomers are nearly identical (backbone RMSD value of 0.33 Å). Each monomer presents an N-terminal coiled-coil loop (residues 18–35), a catalytic domain (residues 36–179) showing a fold related to that of the peptidoglycan-recognizing proteins (PGRPs) and, finally, a globular C-terminal domain (residues 180–259, Figure 3A). The 17-amino-acid loop (residues 108–125), formed by the β 5- β 6 motif, is a significant part of the active site. The closest structural homologues of AmpDh2 are AmiD, an amidase from *E. coli*¹¹ and the active conformation of amidase AmpD from *Citrobacter freundii*¹² (Figure S1). Structural comparison with AmpD reveals that the r4 region, critical to substrate stabilization,¹² is conserved in AmpD and AmpDh2, while regions r2 and r3, key in the unique activation process for the cytoplasmic AmpD, are absent in AmpDh2 (Figure S1). The AmpDh2 active site is an L-shaped cavity with a ~ 24 Å-long segment for the peptide-stem binding and a ~ 30 Å-long trough for glycan binding, with the catalytic zinc ion located at the junction of the two (Figure 3A). The pentapeptide product of hydrolysis of the synthetic substrate by AmpDh2 (Ala- γ -D-Glu- m -DAP-D-Ala-D-Ala) is found in the complex in both monomers, except the terminal D-Ala is not seen in the density and is likely mobile (Figures 3B and S2). As the saccharide was released from this complex, we determined the complex of AmpDh2 with a synthetic NAG-NAM-NAG-NAM sample, which mapped out the saccharide-binding areas.

The apo enzyme and the two product-complex structures show few differences. One difference is, the side-chain movement of Trp85, which is accompanied by movement of Asn31' from its dimeric partner (Figures 3B and S2B). The peptide is strongly stabilized by four salt-bridge interactions (with Arg160, Lys161, Arg83 and Arg95' from the dimeric partner), while hydrophobic residues (especially Trp85 and

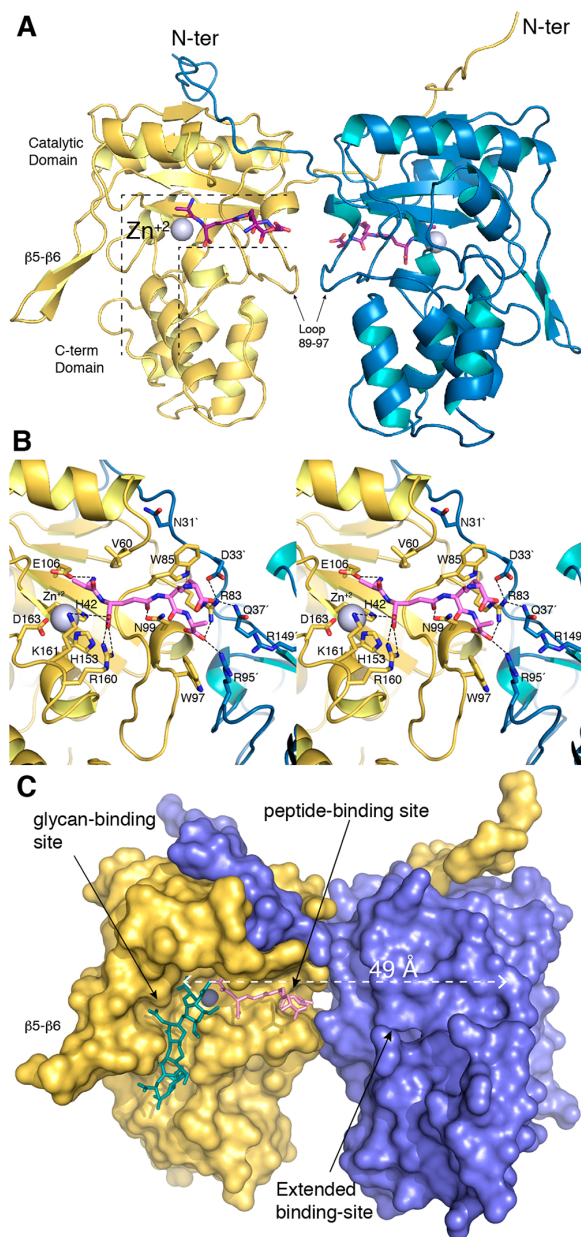


Figure 3. (A) Dimeric 3D structure of AmpDh2 in complex with the peptide product, with the secondary structure elements shown. The active site for monomer in yellow is indicated with the dotted black lines, with the active site for the blue monomer located on the opposite side. The catalytic zinc ions are shown as spheres. (B) Stereo view showing the interactions between AmpDh2 and the bound peptide stem. The residues forming the active site are drawn in capped sticks. Carbon atoms of the peptide are in pink, while those in the protein are color coded as in panel A. Salt bridges and hydrogen bonds are shown as dashed lines. (C) Molecular surface representation of AmpDh2 in complex with the stem peptide (pink capped sticks). The synthetic NAG-NAM-NAG-NAM (green sticks) observed in the AmpDh2:4S complex is superimposed to reveal the glycan-binding site. Glycan- and peptide-binding sites are labeled. The extended peptide-binding site is shown by the dashed white line (49 Å).

Trp97) build a surface on which the backbone of the peptide stem is accommodated. The catalytic machinery of AmpDh2 resembles that of a typical zinc protease, comprised of the zinc ion, Glu106, as the requisite active-site base, and Lys161, likely involved in stabilization of the tetrahedral high-energy species en route to hydrolysis of substrate.^{11–13} The AmpDh2:4S complex reveals, for the first time, that the active site can accommodate nicely the NAG-NAM backbone in a ~ 30 Å-long glycan-binding site in which the $\beta 5$ strand clamps down on the substrate (Figures 3C and S3). The NMR structure of the peptidoglycan reveals the saccharide backbone as a right-handed helix, with the stem peptides projecting outward with a three-fold symmetry.¹⁴ When this solution structure was superimposed onto the AmpDh2 complexes, we noted that the right-handed helicity of the saccharide portion of the peptidoglycan makes available the peptide stems for binding to specific surface grooves within the structure (Figure 4).

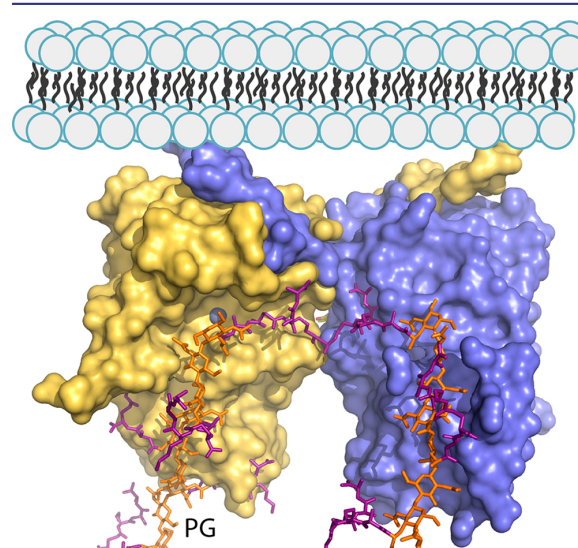


Figure 4. AmpDh2 dimer interacting with a cross-linked peptidoglycan chain. The peptidoglycan is shown as a capped stick with glycan chains colored in orange and peptide stems in magenta. The N-terminal anchor segment would interact with the inner leaflet of the outer membrane. The pseudo-two-fold axis for the dimer indicates that the protein can bind simultaneously to two different segments of the peptidoglycan in its 3D structure.

In agreement with the sedimentation velocity analysis, the two molecules in the asymmetric unit are arranged as a dimer by strong interactions through their N-terminal extensions (Figures 3A,C and S4). Each N-terminal segment extends over a distance of 50 Å, embracing the catalytic domain of the partner protein. The dimer is further stabilized by interactions through the pair of 89–97 loops (Figure 3A). Interestingly, the dimeric structure predisposes both N-terminal segments sequestered in the same direction. This arrangement allows for interactions with the membrane by the N-terminal membrane-anchor segments. This structural architecture has two implications for substrate recognition. First, the two N-terminal loops and the 89–97 loops directly participate in stabilization of the peptidoglycan peptide stem (Figure 3B), and second, we note that the alignment of the peptide-binding sites with a surface groove with the other monomer lengthens

this peptide-binding site to ~ 49 Å (Figure 3C). This point is especially pertinent as our experiments with the sacculus indicate that both the cross- and noncross-linked segments of the cell wall serve as substrates for this enzyme (Figure 2). This arrangement indicates that binding of the cross-linked portions of the cell wall can readily be accommodated by AmpDh2, because of the extended binding surface (Figure 4).

We have disclosed in this report the nature of the reactions of AmpDh2 with the bacterial sacculus and have determined the structure of the protein, which reveals the importance of the dimeric nature in accommodating larger segments of the cell wall. The present study reveals at atomic detail the structural attributes of this important virulence factor of *P. aeruginosa* in the reactions that it performs, which are at the roots of the manifestation of the virulence.

■ ASSOCIATED CONTENT

■ Supporting Information

Experimental procedures for structural determination, sedimentation analysis, table of products formed by reaction of AmpDh2 and MltA, and MS/MS analyses of products. Crystallographic coordinates are deposited in the Protein Data Bank (PDB codes 4bj4, 4bol, and 4bpa). This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

mobashery@nd.edu; xjuan@iqfr.csic.es

Author Contributions

[§]These authors contributed equally.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the NIH (GM61629) and by grants BFU2011-25326 (the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness) and S2010/BMD-2457 (the Government of Community of Madrid). The Mass Spectrometry & Proteomics Facility of the University of Notre Dame is supported by grant CHE0741793 from the NSF.

■ REFERENCES

- (1) (a) Young, K. D., Peptidoglycan. In *eLS*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 2011. (b) Suvorov, M.; Fisher, J. F.; Mobashery, S., Bacterial Cell Wall: Morphology and Biochemistry. In *Practical Handbook of Microbiology*, 2nd ed.; Goldman, E.; Green, L. H., Eds.; CRC Press: 2009.
- (2) Shi, Q. C.; Meroueh, S. O.; Fisher, J. F.; Mobashery, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 5274–5283.
- (3) Park, J. T.; Uehara, T. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2008**, *72*, 211–227.
- (4) Johnson, J. W.; Fisher, J. F.; Mobashery, S. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2013**, *1277*, 54–75.
- (5) Boudreau, M. A.; Fisher, J. F.; Mobashery, S. *Biochemistry* **2012**, *51*, 2974–2990.
- (6) (a) Schmidtke, A. J.; Hanson, N. D. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 3922–3927. (b) Juan, C.; Moya, B.; Perez, J. L.; Oliver, A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 1780–1787. (c) Langae, T. Y.; Dargis, M.; Huletsky, A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 3296–3300.
- (7) Zhang, W.; Lee, M.; Heseck, D.; Lastochkin, E.; Boggess, B.; Mobashery, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 4950–4953.
- (8) Moya, B.; Juan, C.; Alberti, S.; Perez, J. L.; Oliver, A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 3694–3700.

(9) Lee, M.; Heseck, D.; Llarrull, L. I.; Lastochkin, E.; Pi, H.; Boggess, B.; Mobashery, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 3311–3314.

(10) Lee, M.; Zhang, W.; Heseck, D.; Noll, B. C.; Boggess, B.; Mobashery, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8742–8743.

(11) Kerff, F.; Petrella, S.; Mercier, F.; Sauvage, E.; Herman, R.; Pennartz, A.; Zervosen, A.; Luxen, A.; Frère, J. M.; Joris, B.; Charlier, P. *J. Mol. Biol.* **2010**, *397*, 249–259.

(12) Carrasco-López, C.; Rojas-Altuve, A.; Zhang, W.; Heseck, D.; Lee, M.; Barbe, S.; André, I.; Ferrer, P.; Silva-Martin, N.; Castro, G. R.; Martínez-Ripoll, M.; Mobashery, S.; Hermoso, J. A. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 31714–31722.

(13) Vallee, B. L.; Galdes, A. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1984**, *56*, 283–430.

(14) Meroueh, S. O.; Bencze, K. Z.; Heseck, D.; Lee, M.; Fisher, J. F.; Stemmler, T. L.; Mobashery, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 4404–4409.

6.3. INFORMACIÓN ADICIONAL

SUPPORTING INFORMATION.

Experimental Procedures.

Sedimentation Velocity Experiments. Sedimentation velocity experiments were performed in an XL-I analytical ultracentrifuge instrument (Beckman Coulter). The loading concentration of AmpDh2¹ was 3.1 μM in 20 mM sodium phosphate buffer, 0.1 M sodium chloride, pH 7.1. Sedimentation velocity experiment was performed at 25,000 rpm at 4 °C using the AN-TI 60 rotor. Protein absorbance was measured at 280 nm. Data were fit using numerical solutions of the Lamm equation using the SEDFIT program². Values were obtained with a 95% confidence interval.

The experimentally obtained s values were converted to standard 20 °C, water conditions ($s_{20,w}$) using equation 1:

$$s_{20,w} = s_{T,B} \cdot \frac{(1-\bar{v}\rho_{20,w}) \cdot (\eta_{T,B})}{(1-\bar{v}\rho_{T,B}) \cdot (\eta_{20,w})} \quad (1)$$

Where $s_{T,B}$ is the s value in the experimental temperature and buffer, \bar{v} is the partial specific volume (0.7387 mL g⁻¹ for AmpDh2), $\rho_{T,B}$ is the buffer density, $\rho_{20,w}$ is the water density, $\eta_{T,B}$ is the buffer viscosity and $\eta_{20,w}$ the water viscosity. The \bar{v} , density and viscosity values for the experimental buffer were calculated using SEDNTERP³.

Sedimentation-Equilibrium Experiments. The loading concentration of AmpDh2 was 4.9 μM in 20 mM sodium phosphate buffer, 0.1 M sodium chloride pH 7.1. Sedimentation-equilibrium experiments were run at centrifuge speeds of 20,000 and 25,000 rpm at 4 °C. Samples were considered to have reached equilibrium when two scans taken 6 hours apart were superimposable. Data were fit using equation 2.

$$A(r) = \alpha_n \exp[\sigma_n(r^2 - r_o^2)] + \zeta \quad (2)$$

Where $A(r)$ is the absorbance at radial position r , α_n is the absorbance of protein (n) at r_o , ζ is the baseline offset and σ_n is the effective reduced molecular weight. The effective reduced molecular weight is calculated using equation 3:

$$\sigma_n = M_n(1 - \bar{v}_n\rho)\omega^2/2RT \quad (3)$$

Where M_n is the molecular weight of the protein n , \bar{v}_n is the partial specific volume of the protein, ρ is the solvent density, ω is the angular velocity, R is the gas constant and T is the absolute temperature in Kelvin.

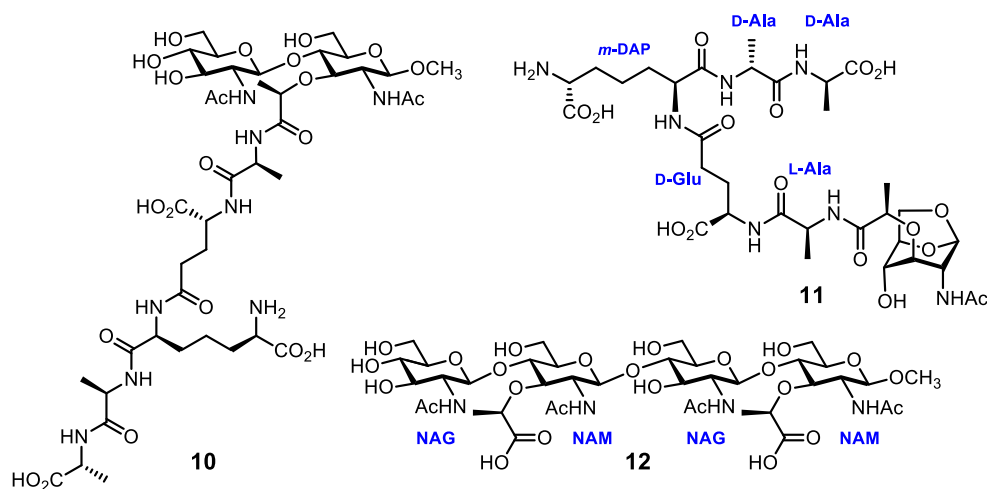
Reaction of AmpDh2/MltA with the bacterial sacculus. The sacculus of *P. aeruginosa* PA01 was isolated by the general procedure described previously^{1,4}. Each reaction mixture contained 140 μL of the sacculus preparation and 0.9 μM of AmpDh2 in 20 mM phosphate, pH 8.0, and was incubated at 37 °C on an orbital shaker. The reactions were stopped after 24 h of incubation by boiling of the mixture for 3 min. Each reaction mixture was concentrated under reduced pressure. The residue was reconstituted in 400 μL of 10 mM acetate buffer with 10 mM MgCl₂, pH 4.0 and MltA (1.25 μM) was added. The resulting mixture was incubated at 37 °C for 4 h. The mixture was boiled for 3 min and was concentrated under reduced pressure. The residue was taken up into water and the resulting suspension was centrifuged. The supernatant was separated and was used for analysis by LC/MS or LC/MS/MS.

Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. LC/MS and LC/MS/MS conditions were described previously⁴. Briefly, the Bruker electrospray ionization source was operated in the positive ion mode with the following parameters: end plate offset voltage = -500 V, capillary voltage = 2000 V, and nitrogen was used as both a nebulizer (4 bar) and dry gas (6.0 L/min flow rate at 200 °C

temperature). LC separations were performed on a Dionex Acclaim™ PolarAdvantage II C18 column with the mobile-phase gradient consisting of elution at 0.5 mL/min with 98% A/2% B for 5 min, followed by a 40-min linear gradient to 83% A/17% B (A = 0.1% formic acid in water; B = 0.1% formic acid in acetonitrile).

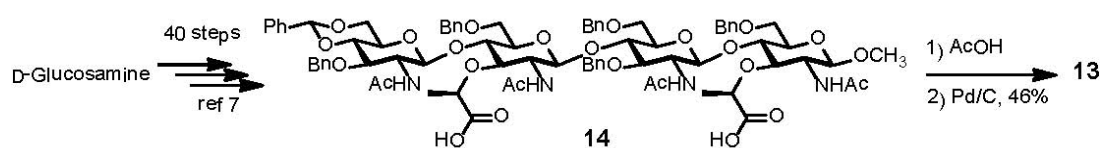
Quantification. Peak areas from extracted-ion chromatograms of the corresponding m/z values were integrated and normalized to the internal standard (compound **11**)⁵. Amounts of reaction products were calculated as a percentage of the total peak area of products found. Total peak areas included the contributions from peak areas of charge states +1, +2, +3, +4, and +5, when present.

Chart S1. Chemical structures of compounds used in this study.



Synthesis of Compounds. Compounds **11** and **12** were prepared according to the literature methods developed by our laboratory.^{5,6} Compound **14** (below) was prepared from D-glucosamine in 40 convergent steps according to a literature procedure.⁷

β -Methyl 2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3-O-((R)-1'-carboxyethyl)-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-2-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-2-acetamido-3-O-((R)-1'-carboxyethyl)-2-deoxy- β -D-glucopyranoside (β -methyl NAG-NAM-NAG-NAM, **13).** Compound **14** (150 mg, 0.10 mmol) was dissolved in AcOH (3 mL) and the solution was stirred at 80 °C for 1 h. Methanol (3 mL) and 10% Pd/C (0.10 g) were added to the reaction mixture and the suspension was stirred for 18 h. The reaction mixture was filtered through a layer of Celite and the residue was washed with MeOH. The combined filtrate was concentrated to dryness under reduced pressure. The HPLC purification (Sunfire C18, 100 Å, 19 x 150 mm using a linear gradient from 2 to 20% acetonitrile in water supplemented with 0.1% TFA over 20 min) of the crude product gave the desired tetrasaccharide (45 mg, 46%). ¹H NMR (500 MHz, D₂O) δ 1.42, 1.44 (2 x d, J = 7.0 Hz, 6H; 2Lac-CH₃), 1.98, 2.02, 2.07 (3 x s, 12H; 4NHCOCH₃), 3.36 - 3.95 (m, 24H), 3.46 (s, 3H; OCH₃), 4.38 (d, J = 8.2 Hz, 1H), 4.47 - 4.57 (m, 5H); ¹³C NMR (126 MHz, D₂O) δ 18.4, 18.5 (2 x q, 2Lac-CH₃), 22.2, 22.45, 22.47, 22.49 (4 x q, NHCOCH₃), 54.7 (d), 55.0 (d), 55.5 (d), 56.2 (d), 57.2 (q, OCH₃), 59.9 (t), 60.0 (t), 60.6 (t), 61.4 (t), 70.5 (d), 72.3 (d), 73.7 (d), 74.9 (d), 75.2 (d), 75.4 (d), 76.4 (d), 77.6, 77.7 (2 x d, 2Lac- α -C), 79.9 (d), 80.0 (d), 80.1 (d), 100.2 (d), 100.3 (d), 101.7 (d), 102.1 (d), 174.61, 174.68, 174.74, 174.8, 177.6, 177.7; HRMS (ESI), calcd for C₃₉H₆₄N₄O₂₅ (M+H⁺), 989.3932, found 989.3897.



Scheme S1. Synthesis of the tetrasaccharide **13**.

Crystallization. Prior to crystallization, the purified AmpDh2 was dialyzed against citrate buffer (20 mM, pH 5.0) and concentrated to 8 mg/mL. Crystallization trials were set up at 291 K using the sitting-drop vapor-diffusion method. Good quality crystals were grown in 0.2 M potassium thiocyanate, 0.1 M bis-tris propane (1,3-bis(tris(hydroxymethyl)methylamino)propane), pH 7.5 and 18% PEG 3350. The mixture consisted of equal volumes of protein with precipitant solution (1 μ L) and equilibrated against 500 μ L of the reservoir solution. The crystals were soaked into cryoprotectant solution (paratone/paraffin oil, proportion 7:3), before flash cooling at 100 K. The complex of AmpDh2 with L-Ala- γ -D-Glu-*m*-DAP-D-Ala (AmpDh2:5P complex) was obtained by soaking native crystals in a 15 mM solution of compound **12** mixed with the crystallization condition (18% PEG 3350, 0.1 M bis-tris propane, pH 7.5, 0.2 M potassium thiocyanate). The crystals were soaked in paratone with cryoprotectant solution before flash cooling at 100 K. The complex of AmpDh2 with β -methyl NAG-NAM-NAG-NAM (**13**, AmpDh2:4S complex) was obtained by soaking native crystals in a 40 mM solution of compound **13** mixed with the crystallization condition (18% PEG 3350, 0.1 M bis-tris propane, pH 7.5, 0.2 M potassium thiocyanate). The crystals were soaked in paratone/paraffin oil before flash cooling at 100 K.

Data collection and processing. X-ray diffraction data set for AmpDh2 crystal was collected on beamline PX at the Swiss Light Source (SLS) Villigen, Switzerland. The data set was processed using XDS⁸ and scaled using SCALA from CCP4⁹ program suite. AmpDh2 crystallized in space group $P2_12_12_1$, with unit cell parameters $a = 48.76$ Å, $b = 100.42$ Å, $c = 104.26$ Å. For the AmpDh2:5P complex a complete X-ray diffraction data set was collected using synchrotron radiation source at the Swiss Light Source (SLS), using a Pilatus 6M detector and fixed wavelength of 1.0064 Å. Collected images were indexed, integrated using XDS and scaled with SCALA. Crystals of AmpDh2:5P complex belonged to the orthorhombic space group $P2_12_12_1$ with cell dimensions of $a = 47.63$ Å, $b = 97.23$ Å, $c = 104.17$ Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$, and two monomers in the asymmetric unit. For the AmpDh2:4S complex a complete X-ray diffraction data set was collected using synchrotron radiation source at the ESRF (Grenoble, France) in beamline ID29, using a Pilatus 6M detector and fixed wavelength of 0.9716 Å. Collected images were indexed, integrated and scaled using IMOSFLM and SCALA. Crystals of AmpDh2:4S complex belonged to the orthorhombic space group $P2_12_12_1$ with cell dimensions of $a = 45.23$ Å, $b = 93.56$ Å, $c = 104.35$ Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$, and two monomers in the asymmetric unit.

Structure solution and refinement. AmpDh2 structure was determined by the Molecular Replacement method using the coordinates of native *E. coli* zinc-dependent amidase AmiD (PDB entry 2wkx)¹⁰ as a search model. The rotational and translational searches were performed with the program Phaser from CCP4⁹. The model was manually completed using COOT¹¹ and was refined with PHENIX¹². The R_{work} converged to 0.17 and the R_{free} to 0.21 in the final model. A summary of the refinement statistics is given in Table S1. The complex AmpDh2:5P was solved at 1.7 Å resolution using the Molecular Replacement method with the AmpDh2 structure using MOLREP¹³. The initial model was refined using PHENIX¹⁴. Final values for R_{work} and R_{free} are 0.15 and 0.18 respectively. There is almost no difference between the structure of the native protein and the one with the complex. For AmpDh2:5P, the rmsd value for the C α compared to the native structure is 0.203 Å for chain A and 0.241 Å for chain B. The product L-Ala- γ -D-Glu-*m*-DAP-D-Ala was clearly identified in the active site of AmpDh2. All of the amino-acid residues in the structure fit perfectly in the Ramachandran plot. The complex AmpDh2:4S was solved at 2.7 Å resolution by Molecular Replacement with MOLREP and refined with REFMAC5¹⁵. Final values for R_{work} and R_{free} are 0.23 and 0.29, respectively. In the case of AmpDh2:4S, the rmsd value for the C α compared to the native structure is 0.434 Å for chain A and 0.389 Å for chain B. The ligand β -methyl NAM-NAG-NAM-NAG was refined with full occupancy and all of the residues fit perfectly in the Ramachandran plot. Data refinement results are summarized in Table S1.

Table S1. Data collection and refinement statistics*

	AmpDh2	AmpDh2:5P complex	AmpDh2:4S complex
Diffraction data statistics			
Wavelength (Å)	1.00002	1.0064	0.9716
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
a, b, c (Å)	48.76, 100.42, 104.26	47.63, 97.23, 104.17	45.23, 93.56, 104.35
α=β=γ	90	90	90
Resolution range (Å)	48.76-1.72 (1.81-1.72)	47.63-1.70 (1.79-1.7)	95.56-2.70 (2.85-2.7)
Unique reflections	54928 (5231)	54041 (7773)	9693 (1089)
Completeness (%)	99.78 (96.46)	100.0 (100.0)	77.0 (60.6)
Redundancy	10.3 (10.8)	13.1 (12.5)	4.2 (3.9)
Rmerge	0.08 (0.56)	0.08 (0.94)	0.13 (0.65)
Average I/σ(I)	28 (4.6)	17.3 (3.1)	9.0 (2.6)
Refinement statistics			
Resolution range (Å)	46.27-1.72 (1.78-1.72)	47.63-1.70 (1.79-1.70)	93.56-2.70 (2.85-2.70)
Rwork/Rfree	0.17/0.20	0.15/0.18	0.23/0.29
No. Atoms			
Protein	3915	3868	3818
Water	871	464	42
Ligand	-	66	70
B-factor (Å²)			
Protein	18.20	28.60	46.80
Water	27.15	35.80	28.80
Ligand	-	33.70	89.3
R.m.s. deviations			
Bond length (Å)	0.007	0.011	0.017
Bond angles (°)	1.14	1.47	1.76
Ramachandran	98.0/0.0	98.0/0.2	95.0/0.4
Favored/outliers (%)			
Residues in the AU	490	486	482
PDB code	4bj4	4bol	4bpa

*Values between parentheses correspond to the highest resolution shells

Table S2. Polar interactions involved in AmpDh2 dimerization.

Hydrogen bonds	Residue (monomer B)	Distance (Å)	Residue (monomer A)
1	ARG 76[N]	2.98	ASN 24[O]
2	SER 61[OG]	2.72	ASN 31[O]
3	ARG 82[NH2]	3.57	GLN 32[O]
4	ARG 82[NE]	3.01	GLN 32[OE1]
5	ARG 76[N]	2.98	ASN 24[O]
6	TRP 85[NE1]	3.60	ASP 33[OD1]
7	ARG 83[NH2]	2.87	ASP 33[OD2]
8	ARG 83[N]	2.73	ASP 33[O]
9	SER 29[OG]	3.78	THR 56[O]
10	ALA 30[N]	2.95	THR 56[O]
11	ASN 24[N]	2.87	VAL 74[O]
12	SER 29[N]	2.91	LEU 77[O]
13	ARG 35[NE]	2.92	GLU 80[O]
14	ARG 35[NH1]	2.91	GLU 80[O]
15	ASP 33[N]	3.20	ARG 83[O]
16	THR 96[OG1]	2.71	GLY 94[O]
17	THR 96[N]	3.03	THR 96[OG1]
18	THR 96[OG1]	3.48	THR 96[OG1]
19	ARG 35[NH2]	3.36	ASN 99[O]
20	ARG 35[NH2]	2.90	ALA 100[O]
21	ARG 35[NH1]	3.00	SER 102[O]
22	ARG 35[NH2]	2.94	SER 102[O]
23	ASN 24[O]	2.94	ARG 76[N]
24	ASN 31[O]	2.77	SER 61[OG]
25	ASN 31[OD1]	3.23	GLY 58[N]
26	ASN 31[OD1]	2.75	GLY 59[N]
27	GLN 32[O]	3.61	ARG 82[NH2]
28	GLN 32 [OE1]	2.99	ARG 82[NE]
29	ASP 33[OD1]	2.75	ARG 83[NE]
30	ASP 33[OD1]	3.05	TRP 85[NE1]
31	ASP 33[OD2]	2.81	ARG 83[NH2]
32	ASP 33[O]	2.76	ARG 83[N]

TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN

33	GLN 37[OE1]	3.35	ARG 83[NH1]
34	THR 56[O]	3.87	SER 29[OG]
35	THR 56[O]	2.99	ALA 30[N]
36	GLY 58[O]	3.86	ASN 31[ND2]
37	GLY 59[O]	2.50	ASN 31[ND2]
38	VAL 74[O]	2.90	ASN 24[N]
39	LEU 77[O]	2.88	SER 29[N]
40	GLU 80[O]	2.99	ARG 35[NE]
41	GLU 80[O]	2.81	ARG 35[NH1]
42	ARG 83[O]	3.13	ASP 33[N]
43	GLY 94[O]	2.66	THR 96[OG1]
44	THR 96[OG1]	3.09	THR 96[N]
45	ASN 99[O]	3.43	ARG 35[NH2]
46	ALA 100[O]	2.88	ARG 35[NH2]
47	SER 102[O]	3.02	ARG 35[NH1]
48	SER 102[O]	2.96	ARG 35[NH2]
Salt-bridge interactions			
1	LYS 69[NZ]	3.30	GLU 10[OE2]
2	ARG 71[NH1]	3.71	ASP 17[OD2]
3	LYS 30[NZ]	2.77	ASP 98[OD1]
4	LYS 30[NZ]	3.53	ASP 98[OD2]
5	GLU 10[OE2]	3.30	LYS 69[NZ]
6	ASP 17[OD2]	3.71	ARG 71[NH1]
7	ASP 98[OD1]	2.77	LYS 30[NZ]
8	ASP 98[OD2]	3.53	LYS 30[NZ]

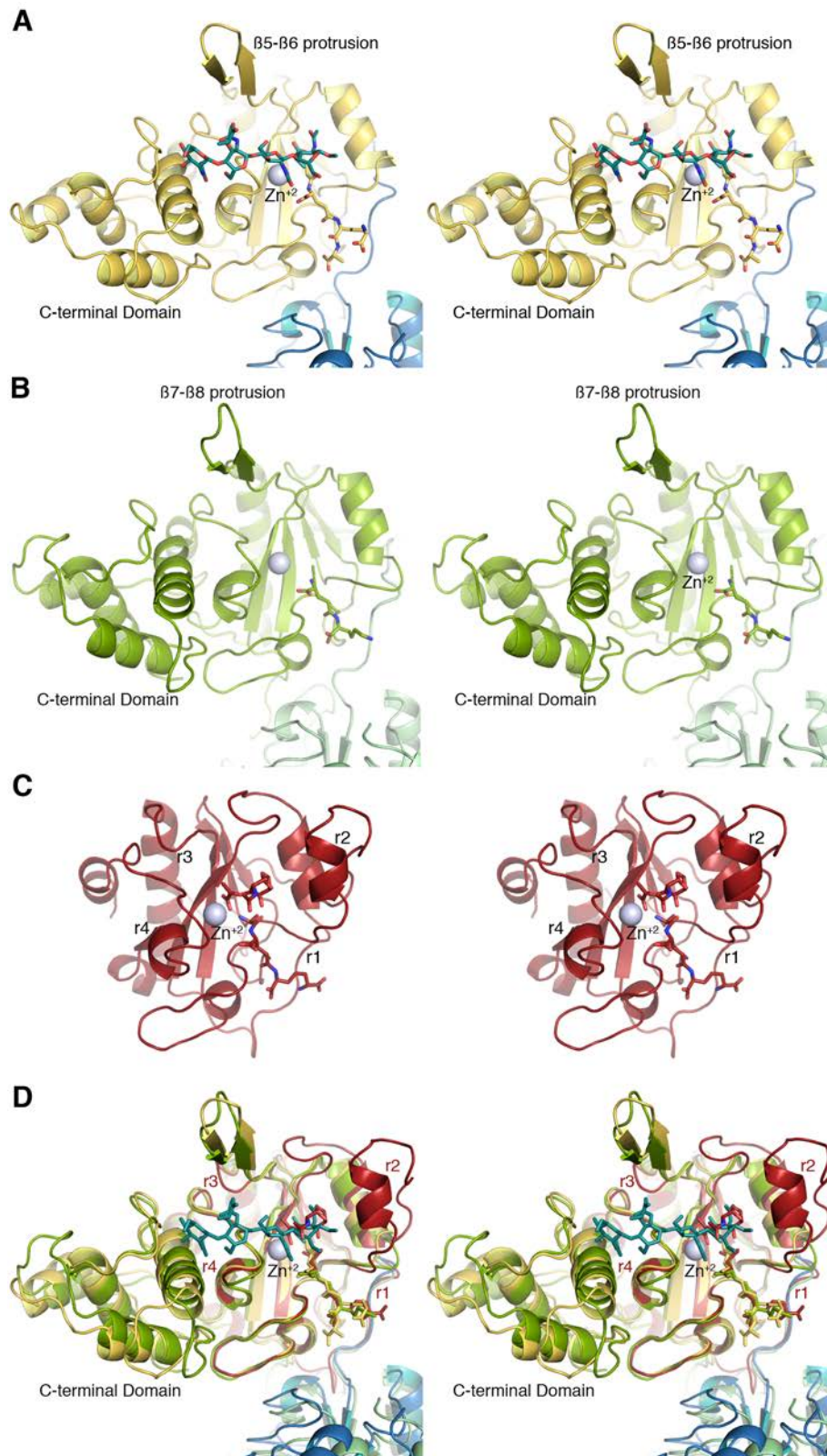


Figure S1. Ligand recognition in AmpDh2 (A), AmiD (B) and AmpD (C). As assessed by DALI server¹⁶, the closest structural homologues of AmpDh2 are AmiD, an amidase from *E. coli* (Z score 32.0, RMSD of 2 Å for 257 Cα atoms)¹⁰ and the active conformation of the peptidoglycan-recycling amidase. AmpD from *Citrobacter freundii* (Z score 18.7, RMSD 1.6 Å for 176 Cα atoms).¹⁷

(A) Three-dimensional structure of the AmpDh2:5P complex. The synthetic NAG-NAM-NAG-NAM (green sticks) observed in the AmpDh2:4S complex is superimposed to reveal the glycan-binding site. This is the first time a glycan chain is observed attached to a PG amidase. Monomer A and B are

coloured differently (yellow and blue, respectively). The reaction product (Ala- γ -D-Glu-*m*-DAP-D-Ala) is represented as yellow sticks. (B) Three-dimensional structure of *E. coli* AmiD-tripeptide complex.¹⁰ The tripeptide is represented as green sticks. (C) The crystal structure of active AmpD from *C. freundii* in complex with the reaction products (anhydro-MurNAc and tripeptide, depicted as red sticks).¹⁷ Activation observed in cytoplasmic AmpD involves large structural rearrangements (in both backbone and side chains) of the regions r2-r4, which are virtually unconnected through space to each other in the inactive form, but converge to come in close contact with one another in the active structure of AmpD.¹⁷ The largest changes were observed in the r2 region. (D) Stereo view showing the structural superimposition of all related amidases. The C-terminal domain and the β 5- β 6 protrusion, involved in peptidoglycan recognition, are conserved in AmpDh2 and AmiD. Structural comparison with active of AmpD reveals that regions r2 and r3, key in the activation process, are absent in AmpDh2. The r4 region, critical to substrate stabilization, is conserved in AmpD and AmpDh2. The region r1 involved in stabilization of the terminal end of the peptide stem is absent in AmpDh2, but is replaced by the N-terminal segment from the dimeric partner.

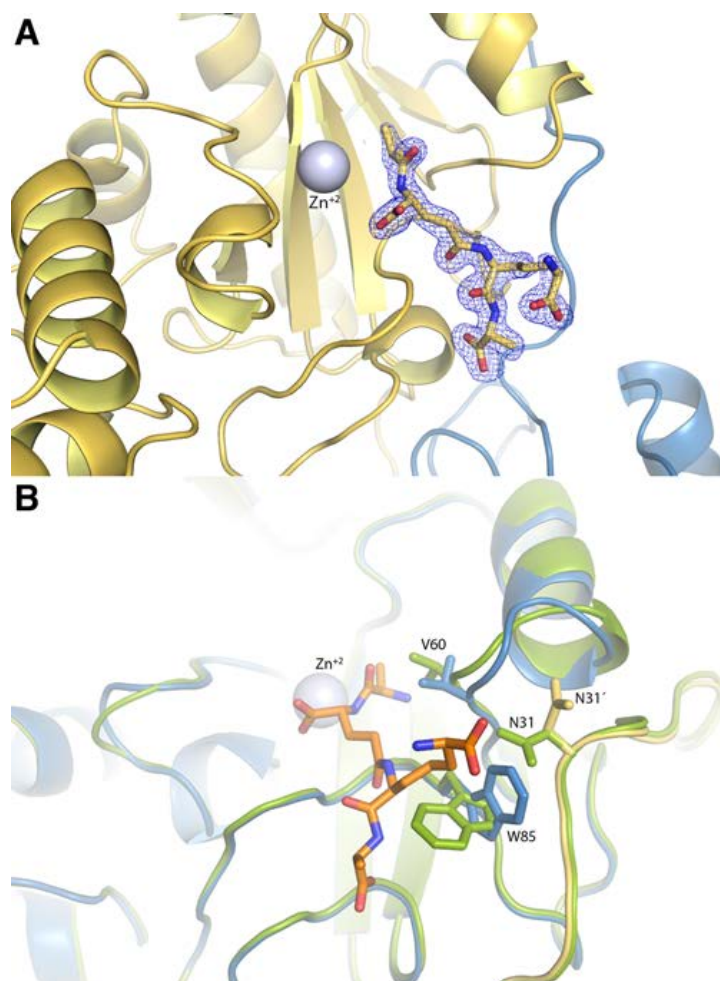


Figure S2. Tetrapeptide recognition by AmpDh2. (A) Electron density for the reaction product (Ala- γ -D-Glu-*m*-DAP-D-Ala) observed in the AmpDh2:5P complex. Electron density corresponds to the (2Fo-Fc) map contoured at 1 σ . (B) Structural changes in AmpDh2 upon ligand binding. Apo AmpDh2 is coloured in green and AmpDh2-product complex in blue (chain A) and in yellow (chain B). The ligand is represented in orange sticks. Residues with the most relevant changes are depicted in sticks.

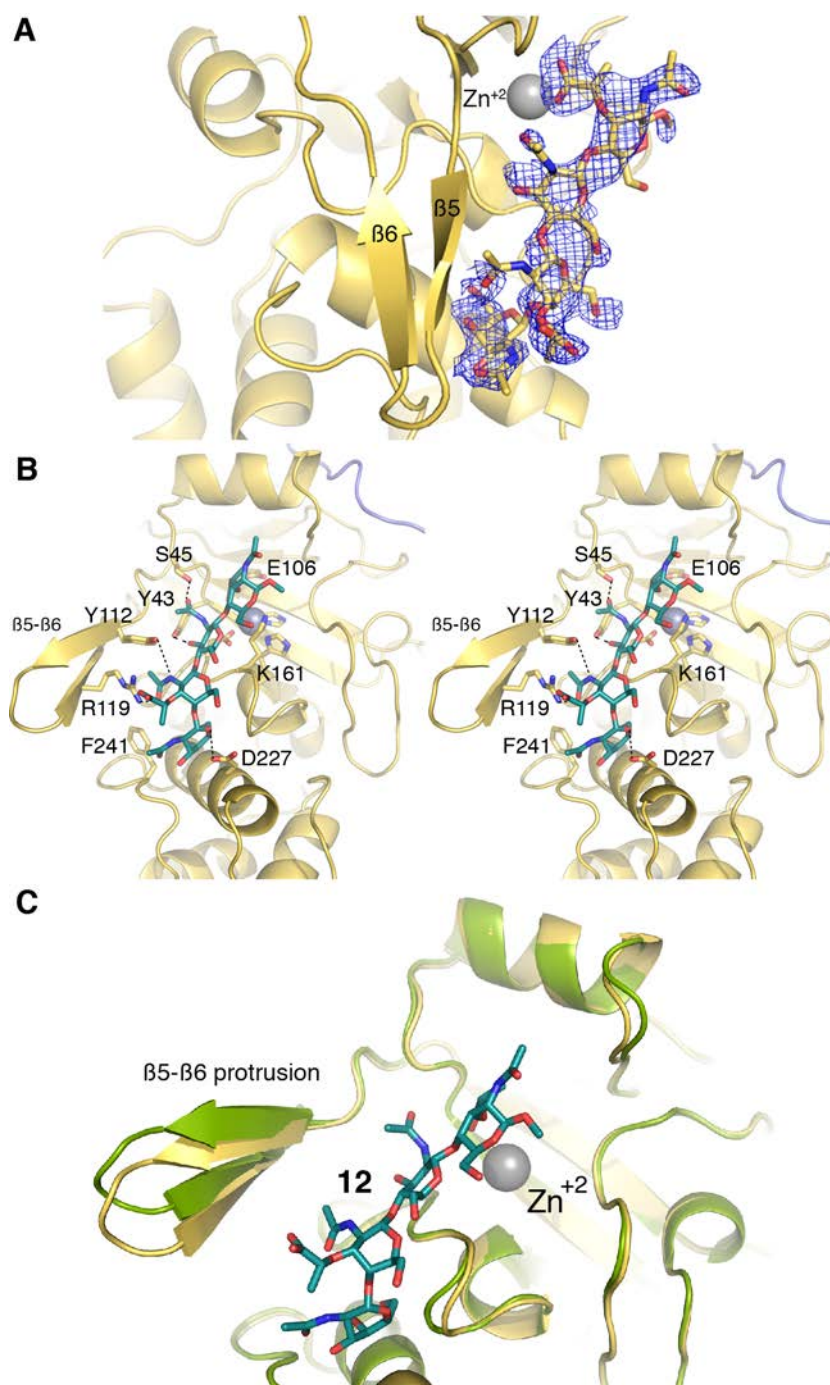


Figure S3. Tetrasaccharide **13** (β -methyl NAG-NAM-NAG-NAM) recognition by AmpDh2. (A) Electron density for the tetrasaccharide **13** observed in the AmpDh2:4S complex. Electron density corresponds to the (2Fo-Fc) map contoured at 0.8 σ . (B) Stereo view showing the tetrasaccharide (green sticks) at the glycan-binding site of AmpDh2. Relevant residues lining the cavity are drawn as yellow sticks. Catalytic zinc ion (grey sphere) and residues coordinating it are also depicted. (C) Structural changes in AmpDh2 upon tetrasaccharide binding. Apo AmpDh2 is coloured in green and AmpDh2:4S complex in yellow. The β 5- β 6 protrusion clamps down on the substrate.

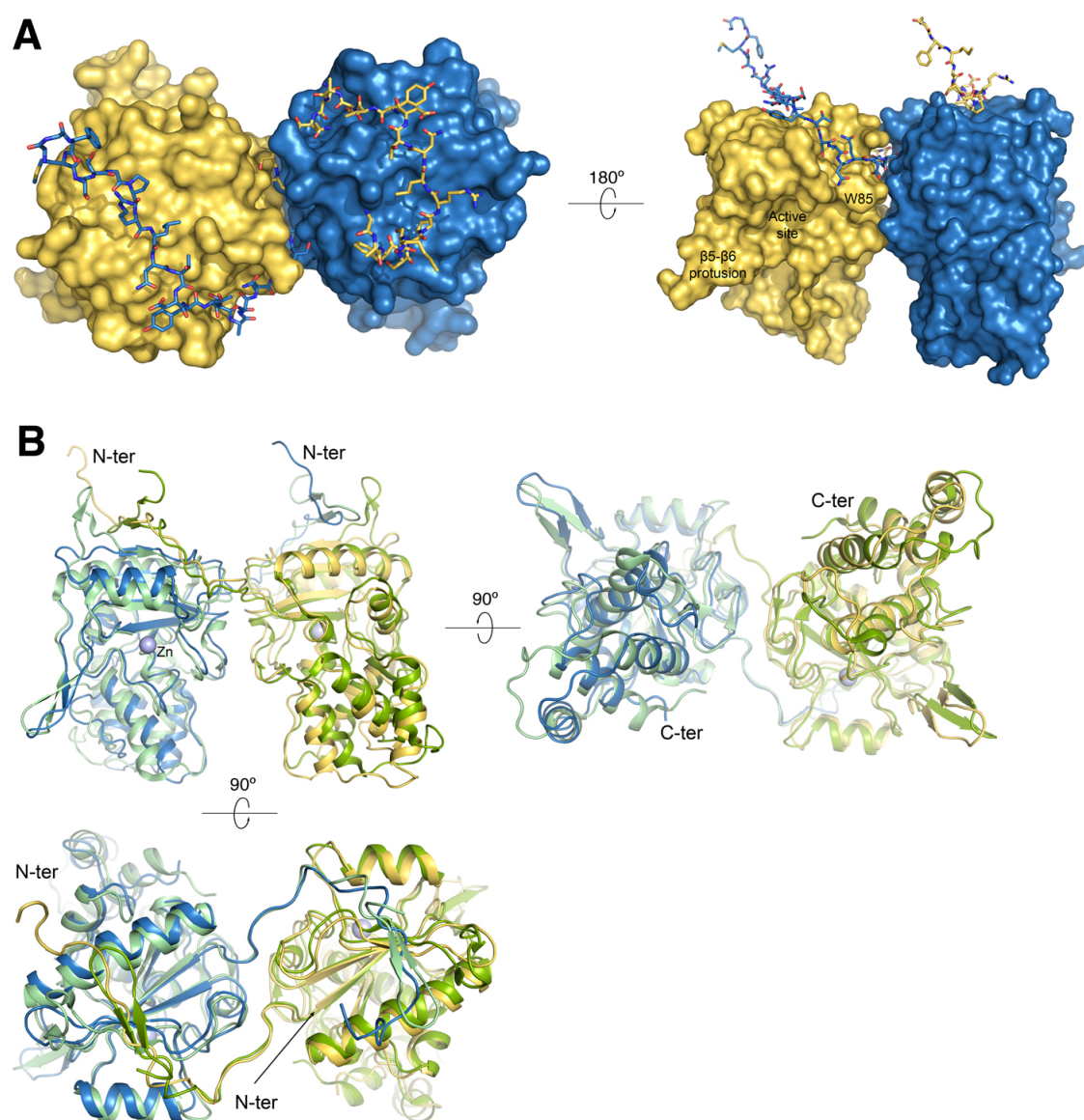


Figure S4. (A) Dimer arrangement in AmpDh2. Chain A is coloured in yellow and chain B in blue. N-Terminal segment is represented as sticks and the remaining part as molecular surface. All the interactions involved in dimer formation are detailed in Table S2. (B) Comparison between oligomeric arrangement in AmpDh2 (coloured as in panel A) and in *E. coli* AmiD (coloured in green). In AmiD the asymmetric unit contains a single protein molecule, but AmiD forms a dimer with a symmetry-related molecule.¹⁰ AmiD dimer follows the same structural arrangement observed for AmpDh2.

Sedimentation Velocity/Equilibrium Experiments

Sedimentation velocity (SV) data were fit with numerical solutions of the Lamm equation using SEDFIT². Experimental SV data for AmpDh2 showed the presence of one species with an apparent mass ($M_{app} = 58,000 \pm 5000$) consistent with a dimeric species (Figure S5A). The expected molecular weight of the dimer is 57,780 and the experimentally calculated M_{app} values are within the error of the calculated molecular weights. The experimentally obtained $s_{20,w}$ value for the corresponding dimeric species is 3.74 ± 0.25 (Figure S5B). The fitted SV experimental data with low residual error is also shown (Figure S5C). The data from sedimentation equilibrium (SE) experiments were best fit to a single-species model using the molecular weight of the AmpDh2 as a dimer (Figure S6). The combined SV and SE results indicated that AmpDh2 exists as a dimer in solution.

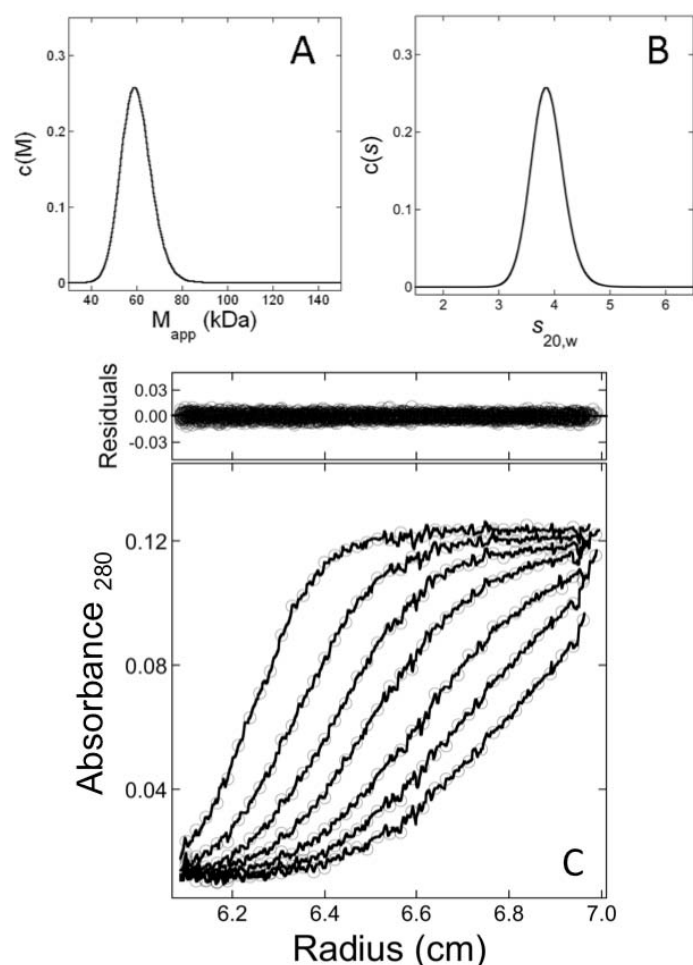


Figure S5. Sedimentation velocity analysis of AmpDh2 (3.1 μ M) in 20 mM sodium phosphate, 0.1 M sodium chloride, pH 7.1, at 25,000 rpm at 4 °C. (A) Experimentally obtained apparent molecular weights for AmpDh2 under above conditions. (B) Experimentally obtained s values converted to $s_{20,w}$ values for AmpDh2 under above conditions. (C) Plot shows a sample of experimentally obtained data fit to the Lamm equation using SEDFIT² and the residual values of the fitted data.

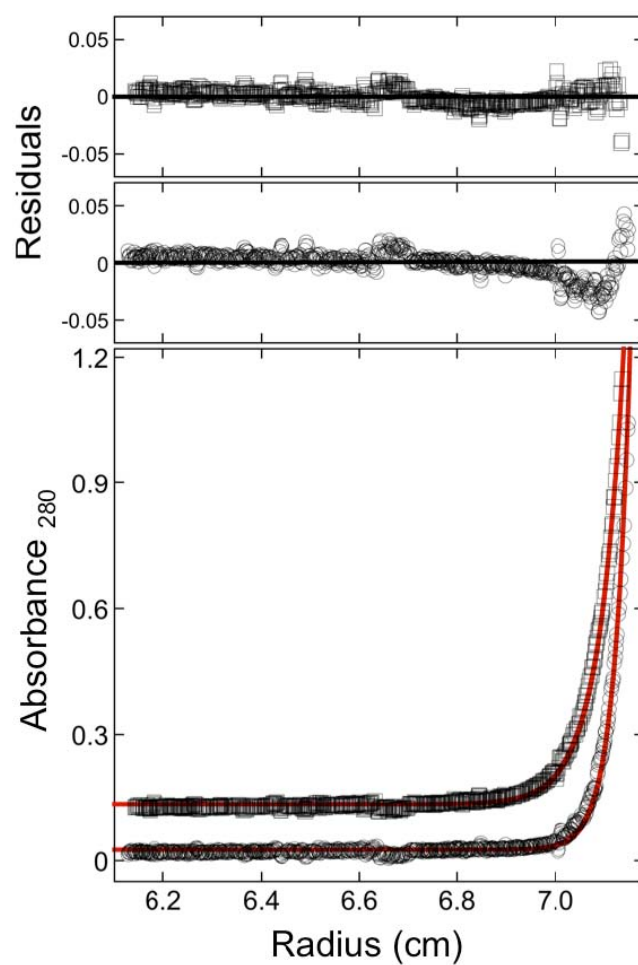


Figure S6. Sedimentation equilibrium analysis of AmpDh2 ($4.9 \mu\text{M}$) in 20 mM sodium phosphate, 0.1 M sodium chloride, pH 7.1, at 20,000 rpm (open squares) and 25,000 rpm (open circles) at 4 °C. Plot shows a sample of experimentally obtained data for both rotor speeds fit to equation 2 and the residual values of the fitted data. The data for the 20,000 rpm was offset on the y axis for visual clarity.

Chart S2. Chemical Structures of the Products of the Sequential Reactions of AmpDh2 and of MltA with Pseudomonal Sacculus listed in Table S1.

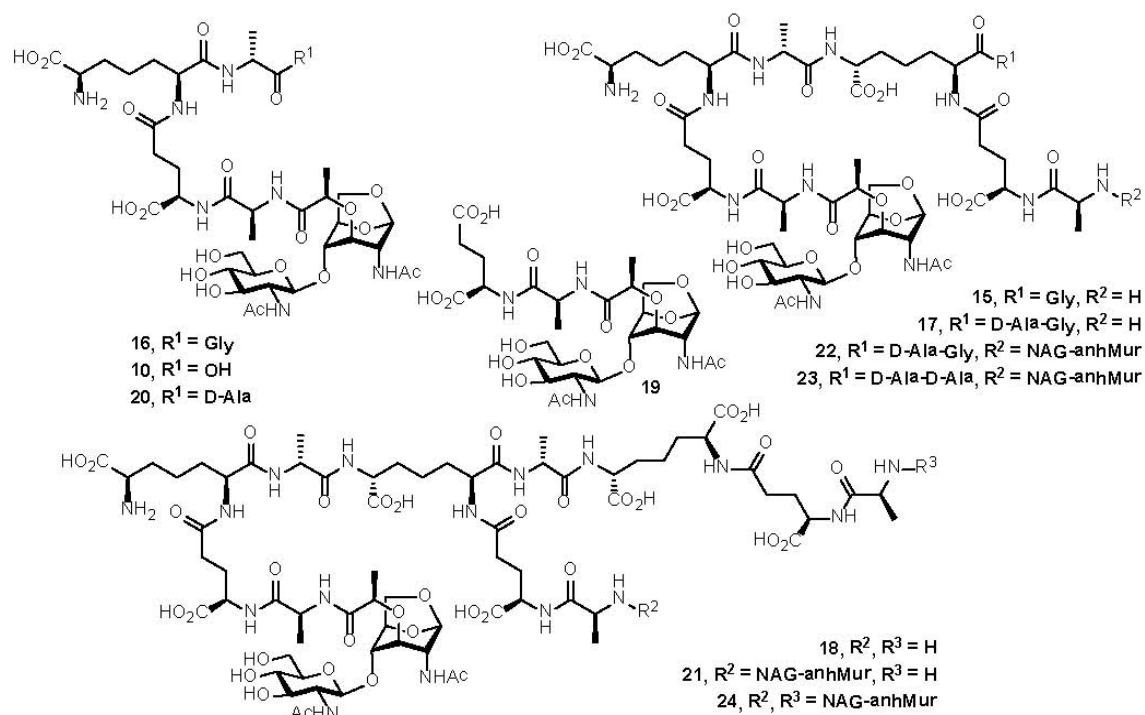


Table S3. The list of the products of the sequential reactions of AmpDh2 and of MltA with bacterial sacculus prepared from the stationary and log-phase cultures^a.

Name ^b		theoretical <i>m/z</i>	observed <i>m/z</i>	sacculus	
				Stationary-phase	Log-phase
NAG-anhMur	1	479.187 ⁺	479.187 ⁺	40%	65%
TriA1	2	851.352 ⁺	851.353 ⁺	4%	0.7%
TetraTriGlyA1	14	676.291 ²⁺	676.292 ²⁺	0.1%	ND ^c
TetraGlyA1	15	979.410 ⁺	979.411 ⁺	0.03%	ND ^c
TetraA1	3	647.780 ²⁺	647.785 ²⁺	4%	1.6%
	16	922.389 ⁺	922.388 ⁺	0.1%	1%
	17	711.810 ²⁺	711.812 ²⁺	0.2%	0.2%
	18	579.923 ³⁺	579.921 ³⁺	0.7%	0.5%
DiA1	4	683.299 ²⁺	683.301 ²⁺	37%	24%
	19	679.267 ⁺	679.269 ⁺	0.8%	1%
PentaA1	20	993.426 ⁺	993.422 ⁺	0.03%	ND ^c
	5	603.602 ³⁺	603.601 ³⁺	5%	7%
	21	1099.466 ²⁺	1099.463 ²⁺	0.2%	ND ^c
	6	1134.982 ²⁺	1134.981 ²⁺	2%	1%
TriTetraA2	7	877.865 ²⁺	877.864 ²⁺	1%	ND ^c
Tetra2GlyA2	22	941.894 ²⁺	941.891 ²⁺	0.1%	ND ^c
Tetra2A2	8	913.384 ²⁺	913.382 ²⁺	3%	ND ^c
TetraPentaA2	23	948.902 ²⁺	948.901 ²⁺	0.2%	ND ^c
TriTetra2A3	24	886.703 ³⁺	886.706 ³⁺	0.1%	ND ^c
Tetra3A3	9	910.382 ³⁺	910.381 ³⁺	0.3%	ND ^c
				1	0.22 ^d
Products				40%	65%
Partially hydrolyzed products				49%	33%
Unreacted substrates				11%	2%

^a Amounts are expressed as a percentage of the overall peak area; ; ^b Naming conventions are based on the literature⁴; ^c ND, not detected; ^d the total peak area of products found for log-phase sacculus normalized to that of stationary-phase sacculus.

Structure elucidation of partial reaction products by LC/MS/MS.

For the chromatographic peak that eluted at 15.2 minutes, the high-resolution accurate *m/z* value was found to be 683.301, which corresponds to the chemical formula C₅₅H₈₈N₁₂O₂₈. This chemical formula matches two possible structures (**4a** and **4**, see Figure S7A) of the crosslinked octapeptide with one unit of NAG-1,6-anhMur attached to either terminal alanine. Structure **4a** has the dissacharide attached to the acceptor end, while **4** has the dissacharide attached to the donor end. These two structures can be distinguished by their collisionally induced dissociation (CID) mass spectra. For example, only CID of protonated **4a** can generate product ions at *m/z* 993, *m/z* 790, *m/z* 922, and *m/z* 719. On the other hand, only CID of protonated **4** can generate product ions at *m/z* 904, and *m/z* 701. Because compound **8** (see Figure S7B) contains both arrangements of the disaccharide (as in **4** and **4a**) in one molecule, it was used as a reference to confirm that these CID product ions were generated from this structure. Indeed, the CID mass spectrum of protonated compound **8** showed product ions at *m/z* 993, *m/z* 790, *m/z* 922, and *m/z* 719 originated from the **4a** component, and *m/z* 904 and *m/z* 701 originated from the **4** component (Figure S7B). By comparison, the CID mass spectrum of the chromatographic peak, which eluted at 15.2 minutes revealed a product ion at *m/z* 701 (Figure S7A) like structure **4** and no product ions supporting **4a**. Therefore, we assign the predominant species of the 15.2-min eluting peak as **4**. Other observed product ions, which can be generated from both **4a** and **4**, were formed by the concomitant losses of saccharide(s), lactate, alanine, glutamate, diaminopimalate, and alanine (*i.e.* *m/z* 1162, *m/z* 977, *m/z* 834, *m/z* 705, *m/z* 533, and *m/z* 462).

Using the same approach as above, the structure of the 13.4-min chromatographic peak was determined. From the high-resolution accurate mass measurement of the m/z 647.785, the chemical formula $C_{52}H_{83}N_{11}O_{27}$ was deduced. This formula corresponds to the structure of the crosslinked heptapeptide with one unit of NAG-1,6-anhMur attached to one end of the peptide (**3a** and **3**, Figure S8A). CID of protonated **3a** can generate product ions at m/z 922, m/z 719, m/z 851, and m/z 648, while CID of protonated **3** can generate product ions at m/z 904 and m/z 701. To confirm the structure, the CID mass spectrum of **7** (Figure S8B) was used as a reference. Product ions at m/z 922, m/z 904, m/z 851, m/z 719, m/z 701, and m/z 648 were observed in the CID mass spectrum of protonated **7** (Figure S8B). The CID mass spectrum of the chromatographic peak that eluted at 13.4 minutes contained product ions at m/z 719 and m/z 701, which originated from both **3a** and **3**. Therefore, this chromatographic peak contains a mixture of the isobaric co-eluters **3a** and **3** (Figure S8A). Other observed product ions were formed by the concomitant losses of saccharide(s), lactate, alanine, glutamate, diaminopimalate, and alanine (*i.e.* m/z 1091, m/z 906, m/z 763, m/z 634, and m/z 462).

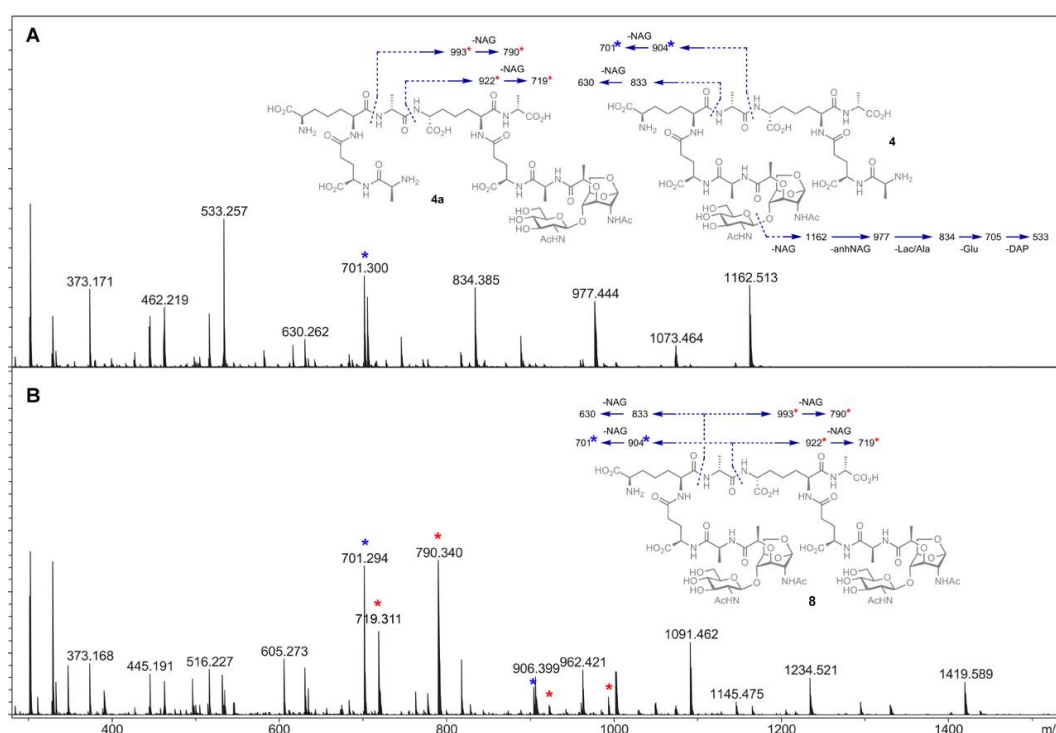


Figure S7. CID mass spectra of the partial-reaction products that eluted at 15.2 minutes (A) and compound **8**. (B) Peaks representing unique fragment ions from protonated **4a** and protonated **4** are indicated by red and blue asterisk, respectively.

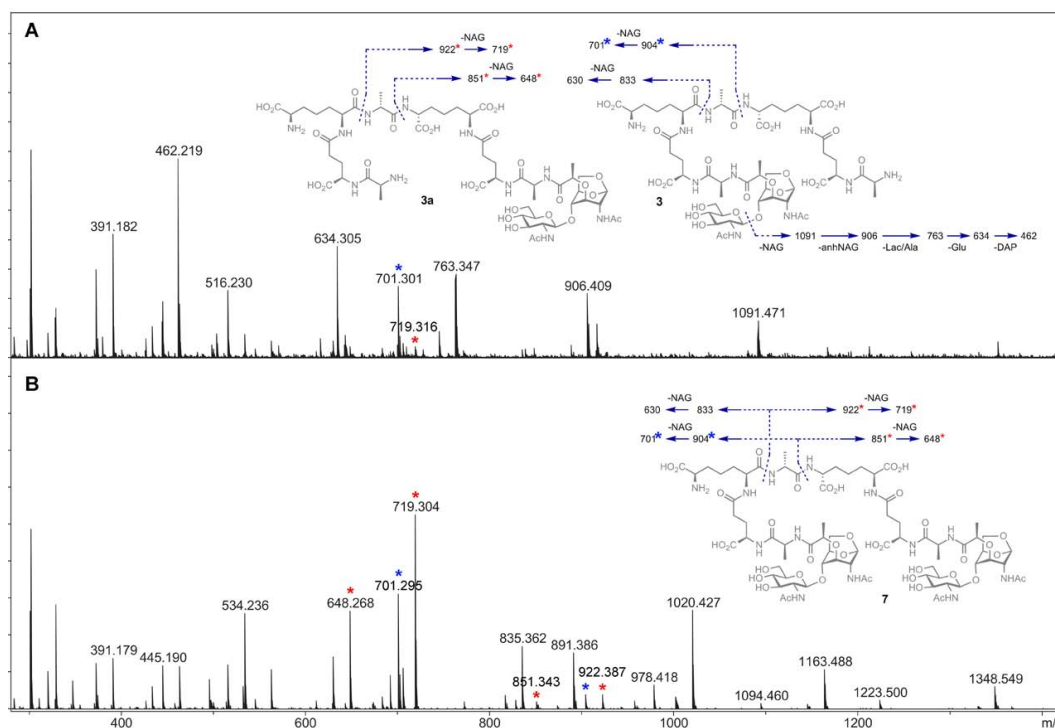


Figure S8. CID mass spectra of the partial-reaction products that elute at 13.4 minutes (A) and compound **7**. (B) Peaks representing unique fragment ions from protonated **3a** and protonated **3** are indicated by red and blue asterisk, respectively.

References:

1. Zhang, W.; Lee, M.; Heseck, D.; Lastochkin, E.; Boggess, B.; Mobashery, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 4950-4953.
2. Schuck, P.; Perugini, M. A.; Gonzales, N. R.; Howlett, G. J.; Schubert, D. *Biophys. J.* **2002**, *82*, 1096-1111.
3. Laue, T. M.; Shah, B. D.; Ridgeway, T. M.; Pelletier, S. L., Computer-aided interpretation of analytical sedimentation data for proteins. In *Analytical ultracentrifugation in biochemistry and polymer science*, Harding, S. E.; Rowe, A. J.; Horton, J. C., Eds.; The Royal Society of Chemistry: Cambridge, 1992; p 90-125.
4. Lee, M.; Heseck, D.; Llarrull, L. I.; Lastochkin, E.; Pi, H.; Boggess, B.; Mobashery, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 3311-3314.
5. Lee, M.; Heseck, D.; Shah, I. M.; Oliver, A. G.; Dworkin, J.; Mobashery, S. *Chembiochem* **2010**, *11*, 2525-2529.
6. Lee, M.; Zhang, W.; Heseck, D.; Noll, B. C.; Boggess, B.; Mobashery, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8742-8743.
7. Heseck, D.; Lee, M.; Morio, K.-I.; Mobashery, S. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 2137-2146.
8. Kabsch, W. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2010**, *D66*, 125-132.
9. Collaborative Computational Project, N. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **1994**, *D50*, 760-763.
10. Kerff, F.; Petrella, S.; Mercier, F.; Sauvage, E.; Herman, R.; Pennartz, A.; Zervosen, A.; Luxen, A.; Frère, J. M.; Joris, B.; Charlier, P. *J. Mol. Biol.* **2010**, *397*, 249-259.
11. Emsley, P.; Cowtan, K. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2004**, *D60*, 2126-2132.
12. Afonine, P. V.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Echols, N.; Headd, J. J.; Moriarty, N. W.; Mustyakimov, M.; Terwilliger, T. C.; Urzhumtsev, A.; Zwart, P. H.; Adams, P. D. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2012**, *68*, 352-367.
13. Vagin, A.; Teplyakov, A. *J. Appl. Crystallogr.* **1997**, *30*, 1022-1025.
14. Adams, P. D.; Afonine, P. V.; Bunkoczi, G.; Chen, V. B.; Davis, I. W.; Echols, N.; Headd, J. J.; Hung, L. W.; Kapral, G. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; McCoy, A. J.; Moriarty, N. W.; Oeffner, R.; Read, R. J.; Richardson, D. C.; Richardson, J. S.; Terwilliger, T. C.; Zwart, P. H. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2010**, *D66*, 213-221.
15. Murshudov, G. N.; Skubák, P.; Lebedev, A. A.; Pannu, N. S.; Steiner, R. A.; Nicholls, R. A.; Winn, M. D.; Long, F.; Vagin, A. A. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2011**, *D67*, 355-367.
16. Holm, L.; Rosenström, P. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, W545-W549.
17. Carrasco-López, C.; Rojas-Altuve, A.; Zhang, W.; Heseck, D.; Lee, M.; Barbe, S.; André, I.; Ferrer, P.; Silva-Martin, N.; Castro, G. R.; Martínez-Ripoll, M.; Mobashery, S.; Hermoso, J. A. *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 31714-31722.

6.4. DISCUSIÓN DE AmpDh2

La incubación de AmpDh2 con el sáculo en fase estacionaria, seguida de la reacción de la transglicosilasa lítica MltA para actuar sobre la cadena glicánica, generó tres tipos de productos que fueron detectados por LC/MS/MS: aquellos productos que experimentaron una reacción total (40%), productos parcialmente hidrolizados (49%), y productos no procesados (11%). Por tratarse de una enzima anclada a la membrana, su acceso al interior del PG está limitado, lo que explica el alto porcentaje de productos parciales o no procesados. Además, AmpDh2 es capaz de actuar sobre cadenas de PG con y sin enlaces cruzados.

La AmpDh2 ha demostrado hidrolizar el sustrato separando el péptido y muestra clara preferencia por producir sustratos cortos y solubles que no se encuentren en su forma anhidro, es decir, tal y como se encuentra la cadena de peptidoglicano. La localización celular de AmpDh2 regula su actividad.

Estos resultados se explican tras el análisis de la estructura tridimensional de esta enzima. Se resolvió AmpDh2 y las estructuras de AmpDh2 con el sustrato sintético 1,6-anhNAM-Ala- γ -D-Glu-*m*-DAP-D-Ala-D-Ala (anhidromurámico pentapéptido) y con un tetrasacárido (NAM-NAG-NAM-NAG).

Experimentos de velocidad de sedimentación indicaron que AmpDh2 es un dímero en solución. Igualmente, en la estructura cristalográfica de AmpDh2, se observan dos monómeros en la unidad asimétrica, fuertemente enganchados a través de una zona desestructurada en la región N-terminal y relacionados entre sí a través de un pseudo-eje binario. Además, los residuos 89-97 de la estructura ayudan también a la estabilización del dímero. Cada monómero está formado por una zona sin estructura secundaria al inicio de la proteína (extremo N-terminal, residuos 18-35), un dominio catalítico (residuos 36-179) con un plegamiento similar a las proteínas reconocedoras de peptidoglicano (PGRPs) (Herbold & Glaser, 1975) y un dominio globular (residuos 180-259) en el extremo C-terminal. El extremo N-terminal de ambos monómeros se encontraría anclado a la zona interna de la membrana externa, y es responsable de la dimerización de AmpDh2.

La maquinaria catalítica está formada por el ión Zn^{+2} que se encuentra coordinado tetraédricamente por la His42, His153, Asp163 y una molécula de agua. Además posee un Glu106 requerido para catalizar la reacción ácido-base.

La cristalización de AmpDh2 con el ligando anhNAM-Ala- γ -D-Glu-*m*-DAP-D-Ala-D-Ala (anhidromurámico pentapéptido, AmpDh2:5P) demostró que la proteína se encuentra activa en el cristal ya que se observó el producto de la reacción, la parte peptídica, estabilizada por varios puentes salinos. La disposición dimerica de AmpDh2, con monómeros dirigidos hacia lados opuestos permite la actuación simultánea sobre dos sustratos. Sorprendentemente se observó que la parte trasera del segundo monómero extiende el sitio peptídico hasta unos 49 Å, lo que explicaría los productos de reacción observados para sustratos con cadenas peptídicas cruzadas (Zhang *et al.*, 2013).

La comparación de estructuras entre la forma apo y la forma en complejo no refleja grandes diferencias. Sin embargo, sí que se observa un cambio en la posición del

Trp85, que demuestra ser un residuo clave para el acoplamiento del péptido. El giro de este triptófano sirve para dejar espacio y estabilizar al péptido y viene acompañado de un cambio de la Asn31' del otro monómero.

Con la obtención del complejo de AmpDh2 con el tetrasacárido sintético NAM-NAG-NAM-NAG (AmpDh2:4S) se demostró la existencia de un sitio específico de reconocimiento de la cadena glicánica. Esta es la primera vez que se observa una cadena de azúcares enganchada a una PG amidasa. De esta forma se concluye que el sitio activo de AmpDh2 forma una "L" en torno al átomo de Zn^{+2} , con una longitud de unos 24 Å para la parte peptídica y 30 Å para la parte glicánica. Además, los residuos 108-125 que forman el motivo $\beta 5$ - $\beta 6$ están desplazados respecto a la forma apo, ayudando a la estabilización de los azúcares.

Así pues, las conclusiones fundamentales de este trabajo serían:

- Se han caracterizado los productos de reacción de AmpDh2 sobre sáculos purificados.
- AmpDh2 presenta sitios específicos para el reconocimiento de la cadena glicánica y el brazo peptídico.
- El estado dimérico de la enzima, junto con su anclaje a la membrana, regularía la actividad de la enzima que sería capaz de hidrolizar las partes más externas de cadenas, aisladas o unidas, de peptidoglicano.

7. ARTÍCULO 4.

Cell-Wall Remodeling by the Zinc-Protease AmpDh3 from *Pseudomonas aeruginosa*.

Journal of the American Chemical Society (2013) 135, 12604-12607

7.1. INTRODUCCIÓN A LA AMIDASA PERIPLÁSMICA AMPDH3 Y APORTACIÓN DEL AUTOR

Con el objetivo de estudiar el efecto de las tres AmpDs en la virulencia de *P. aeruginosa*, el grupo de investigación del Dr. Antonio Oliver en el Hospital Son Dureta (Palma de Mallorca) realizó ensayos de infección intraperitoneal en grupos de 16 ratones empleando cepas de *P. aeruginosa* silenciadas en los genes *ampD*, *ampDh2* y *ampDh3*, respectivamente. La proporción de mortalidad en los ratones se monitorizó durante siete días. La inactivación de *ampD* o *ampDh2* no modificó de ningún modo la supervivencia del ratón. Sin embargo, aquellas cepas de *P. aeruginosa* silenciadas en el gen *ampDh3* mostraron una reducción drástica de la mortalidad de los ratones (al 0%) tras siete días de seguimiento (Moya *et al.*, 2008), lo que sugiere que AmpDh3 juega un papel fundamental en *P. aeruginosa* por ser la principal responsable de su virulencia.

AmpDh3 (28.7 KDa, 255 residuos), está situada en el espacio periplásmico, pero a diferencia de AmpDh2, carece de hélice de anclaje a la membrana.

En el caso de AmpDh3, se ha querido demostrar si esta enzima sigue el patrón ya sugerido por AmpDh2 en cuanto al sitio activo y su forma de actuación en la pared celular. Para intentar comprender las implicaciones biológicas de esta enzima, con esta publicación se pretende responder varias cuestiones:

- Cuáles son las diferencias estructurales y bioquímicas entre AmpDh2 y AmpDh3
- Cuáles son las bases moleculares de la reacción catalítica de AmpDh3
- Cómo está implicada AmpDh3 en la virulencia de *P. aeruginosa*

La autora de esta Tesis realizó la cristalización y determinación estructural de los complejos de AmpDh3 con dos análogos de PG: el tetrasacárido pentapéptido y el anhidromurámico pentapéptido, así como su análisis estructural. El análisis ha permitido proponer un innovador mecanismo de reacción para AmpDh3, que explica los resultados obtenidos en los experimentos bioquímicos realizados en el laboratorio del Prof. Mobashery y los estudios previos reportados en la literatura.

7.2. PUBLICACIÓN



Communication

pubs.acs.org/JACS

Cell-Wall Remodeling by the Zinc-Protease AmpDh3 from *Pseudomonas aeruginosa*

Mijoon Lee,^{‡,||} Cecilia Artola-Recolons,^{§,||} César Carrasco-López,^{§,||} Siseth Martínez-Caballero,[§] Dusan Heseck,[‡] Edward Spink,[‡] Elena Lastochkin,[‡] Weilie Zhang,[‡] Lance M. Hellman,[‡] Bill Boggess,[‡] Juan A. Hermoso,^{*,§} and Shahriar Mobashery^{*,‡}

[‡]Department of Chemistry and Biochemistry, University of Notre Dame, Notre Dame, Indiana 46556, United States

[§]Department of Crystallography and Structural Biology, Inst. Química-Física "Rocasolano", CSIC, Serrano 119, 28006 Madrid, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: Bacterial cell wall is a polymer of considerable complexity that is in constant equilibrium between synthesis and recycling. AmpDh3 is a periplasmic zinc protease of *Pseudomonas aeruginosa*, which is intimately involved in cell-wall remodeling. We document the hydrolytic reactions that this enzyme performs on the cell wall. The process removes the peptide stems from the peptidoglycan, the major constituent of the cell wall. We document that the majority of the reactions of this enzyme takes place on the polymeric insoluble portion of the cell wall, as opposed to the fraction that is released from it. We show that AmpDh3 is tetrameric both in crystals and in solution. Based on the X-ray structures of the enzyme in complex with two synthetic cell-wall-based ligands, we present for the first time a model for a multivalent anchoring of AmpDh3 onto the cell wall, which lends itself to its processive remodeling.

Bacterial growth is linked to integrity of the bacterial envelope, which in Gram-negative organisms is comprised of the outer membrane, the cell wall, and the inner membrane. Cell wall, also known as the sacculus, is a unique bacterial structure made up of polymeric repeats of the disaccharide *N*-acetylglucosamine (NAG)-*N*-acetylmuramic acid (NAM) with stem peptides linked to the NAM unit. The full-length stem peptide is *L*-Ala- γ -D-Glu-*m*-DAP-D-Ala-D-Ala (DAP for diaminopimelate; Figure 1) in many Gram-negative bacteria, but various lengths for the stem peptide are found in the sacculus. This building unit is cross-linked to its neighbors through the stem peptides in the course of its biosynthesis.¹ The cell wall imparts critical structural integrity that is required for the survival of the bacterium, hence the cell wall itself and its biosynthetic machinery are targets of antibiotics.²

Cell wall is a dynamic polymer in that it experiences synthesis, recycling, and remodeling in the course of bacterial existence.³ The recycling events lead to degradation of the peptidoglycan to result in compounds that are collectively called muropeptides. A portion of these muropeptides is internalized for the purpose of recycling into peptidoglycan building units. Yet, some muropeptides are involved in signaling events that lead to manifestation of antibiotic resistance³ and/or virulence responses.⁴ In this vein, the

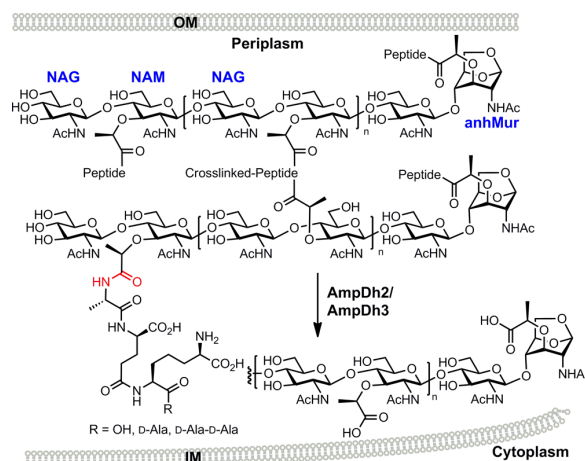


Figure 1. Reactions of AmpDh2 and AmpDh3. OM and IM stand for the outer and inner membranes.

system in *Pseudomonas aeruginosa*, a problematic human pathogen, is of particular interest. This organism has evolved two zinc proteases, annotated as AmpDh2 and AmpDh3, which turn over the cell wall and muropeptides (Figure 1).^{5–7} Expression of the genes for the two enzymes is constitutive.⁷ Indeed, when the genes for both proteins are knocked out, *P. aeruginosa* becomes less virulent.⁸

We have shown that both AmpDh2 and AmpDh3 are periplasmic enzymes and that they have the ability to turn over minimalist synthetic surrogates of cell wall and certain muropeptides involved in the cell-wall recycling.⁵ More recently, we have documented that AmpDh2 is a dimeric protein that inserts itself into the inner leaflet of the outer membrane, where it interacts and hydrolyzes the amide bond between the stem peptide and the NAM moiety of the sacculus.⁶ We identified distinct turnover products for the reaction of AmpDh2 with the cell wall. The enzyme is capable of turning over both the cross-linked and noncross-linked stem peptides.⁶ In the present report, we document that AmpDh3 is a tetrameric protein both in solution and in crystals, whose X-

Received: July 19, 2013

Published: August 9, 2013

ray structure was also elucidated. We determine the nature of the reaction products of AmpDh3 with the cell wall and show that the enzyme interacts preferentially with the polymeric and insoluble component of the cell wall. The present study documents that AmpDh2 and AmpDh3 complement each other in remodeling of the cell wall.

The gene for AmpDh3 was cloned, and the protein was purified to homogeneity, as reported earlier.⁵ We have previously shown that AmpDh3 turns over minimalist synthetic peptidoglycan-mimetic substrates and presented an argument that this enzyme exists in the periplasm.⁵ When we explored the possibility of the reaction of AmpDh3 with the sacculus, we observed very little products, but those that were detected had their peptide stems removed. The minute quantities were detected by LC/MS using the extracted-ion chromatograms (EICs) of target products at the limit of low picomole.⁹ We wanted to know whether the reaction products were indeed present predominantly on the insoluble polymeric sacculus itself and to make a side-by-side comparison to the case of the reactions of the aforementioned paralogous protease AmpDh2. We set up two experiments. One was to use predegreded sacculus by the reaction of MltE of *Escherichia coli*, a lytic transglycosylase that performs predominantly endolytic reactions (cleavage in the middle of the peptidoglycan strand).⁹ The resultant mixture included peptidoglycan strands, both cross-linked and noncross-linked, which would provide greater access to AmpDh3 than would the intact sacculus. Under this condition, we detected 15 fragments of the peptidoglycan by LC/MS total-ion chromatogram (TIC) that had anywhere from $n = 0$ to 14 (compounds 1–15; Figure 2A). All these fragments lacked the peptide stem—cross-linked or noncross-linked—due to the hydrolytic reaction of AmpDh3. The reactions were complete, and the abundance of products was now significant. A control reaction of MltE alone with the sacculus indicated that the hydrolytic activity was that of AmpDh3 (Figure 2B). The chemical structures of the products were further analyzed by LC/MS/MS with comparison to the mass spectrometric outcome of the analysis for the authentic synthetic standard 16 (Figure S1).

The question remains whether AmpDh3 could access its substrates on the intact sacculus. As such, we incubated AmpDh3 with the sacculus first, followed by centrifugation and reconstitution of the pelleted sacculus into a solution with the enzyme mutanolysin. Mutanolysin hydrolyzes the glycosidic bond between NAM and NAG to produce [NAG-NAM-(peptide)]_n (compounds 17–21 in Figure 2C). If there was a reaction by AmpDh3 on the insoluble polymeric sacculus, incubation with mutanolysin would produce a NAG-NAM sugar backbone ladder without the peptide stems. Figure 2D shows LC/MS TIC of the AmpDh3 reaction, followed by that of mutanolysin. The reducing end sugar was reduced by sodium borohydride to eliminate complexity due to the anomeric mixture. The most abundant product was 1'. This is evidence of the ability of AmpDh3 to react with the intact sacculus. The additional products are oligomers of NAG-NAM (2'–6', for $n = 0$ –5). As minor products, the ones with 1,6-anhydromuramic acid at the end were also found (compounds 1–4, for $n = 0$ –3).

For the side-by-side comparison, we performed the same experiments with homogeneously purified AmpDh2 and identified the products. The results for both enzymes are given in Table 1. There are several important observations. The first is on specific activities of these enzymes. Insofar as the

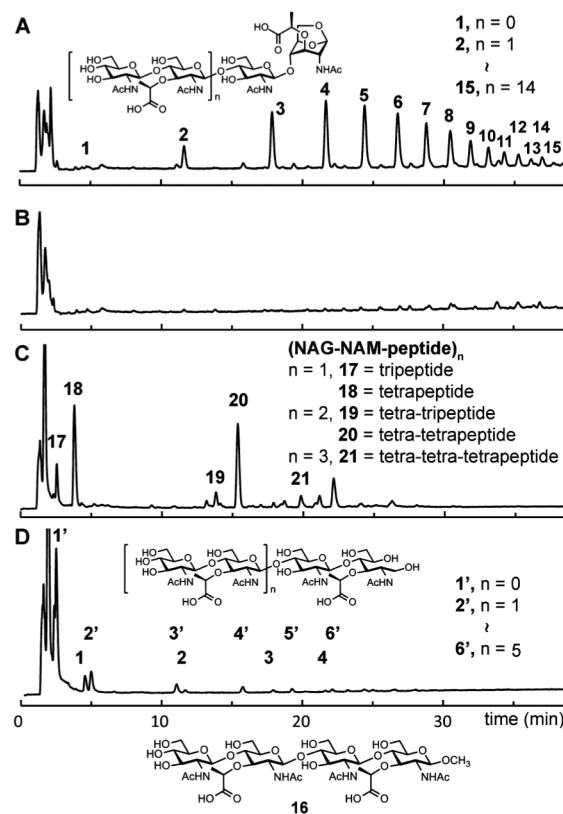


Figure 2. LC/MS TICs of the reaction of AmpDh3 with the MltE-predigested sacculus (A), of MltE alone (B), of mutanolysin alone (C), and of AmpDh3, followed by that of mutanolysin (D).

Table 1. Comparison of Reactions of AmpDh2 and AmpDh3 with Sacculus^a

		soluble ^b	insoluble ^b
AmpDh2	products	3 900 000 (53%)	310 000 (86%)
	partial reaction	3 300 000 (45%)	50 000 (14%)
	substrates	150 000 (2%)	Not detected
	total	7 400 000 (100%)	360 000 (100%)
AmpDh3	products	300 000 (100%)	19 000 000 (93%)
	partial reaction	not detected	1 100 000 (5%)
	substrates	not detected	390 000 (2%)
	total	300 000 (100%)	20 000 000 (100%)

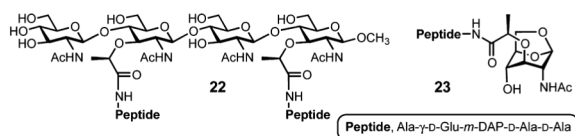
^aAmounts are expressed as the total EIC peak areas. ^bSoluble and insoluble portions were separated by centrifugation of reaction mixtures with sacculus, before digestion by mutanolysin.

amount of enzyme, the amount of sacculus and the length of time for incubation were held the same in all of these reactions, then the quantities of the products would correlate as a first approximation with the specific activities of AmpDh2 and AmpDh3 in their reactions with the sacculus. AmpDh3 is a more active enzyme than AmpDh2 (by roughly 3-fold). Second, both cross- and noncross-linked peptidoglycans are substrates for both enzymes. Notwithstanding that AmpDh3 produces more products for complete hydrolysis (higher specific activity), AmpDh2 produced significantly more partial-reaction products. This includes partial reaction

products for cross-linked peptides, when AmpDh2 cleaves one end but not the other. Third, and strikingly, AmpDh3 exhibits most of its reactions in the insoluble polymeric sacculus fraction, whereas those of AmpDh2 are mostly found in the soluble fractions (Table 1). The profound significance of this last finding is addressed in the context of the X-ray structure for AmpDh3, discussed below.

Sedimentation velocity (SV) data for AmpDh3 in solution were fit using numerical solutions of the Lamm equation.¹⁰ The SV data showed a single peak corresponding to a tetrameric species with an apparent mass, $M_{app} = 117\,000 \pm 7000$ Da (based on the amino acid sequence, the tetramer should be 115 000 Da) with the corresponding $s_{20,w}$ value at 6.12 ± 0.24 (Figures S2 and S3). Hence, AmpDh3 is a tetramer in solution. As described below, it is also so in crystals.

We resorted to solving the X-ray structure of AmpDh3 to address these observations. The apo enzyme was crystallized, and we soaked two synthetic substrates, compounds **22**¹¹ and **23**,¹² into the crystals. As anticipated, the apo enzyme is tetrameric. Crystals of AmpDh3 turned over **22** to produce a complex of the enzyme and the saccharide and peptide products (AmpDh3:**22** complex), whose structure was solved (Table S1). The complex of AmpDh3 with synthetic sample **23** (AmpDh3:**23** complex) was also solved (Table S1), but under conditions where the zinc ion was removed, hence giving the intact compound **23** bound to the active site.



The tetrameric structure for AmpDh3 showed two monomers in the asymmetric unit (A and B) related by a pseudo-two-fold axis that orients the two active sites to opposite sides of the quaternary structure (Figure 3A). The two symmetry-related monomers A' and B' complete the tetrameric structure (Figure 3A). Both monomers in the asymmetric unit are nearly identical (backbone root-mean-square deviation value of 0.38 Å), with a typical metal-binding coordination sphere for zinc proteases. Each monomer presents an N-terminal coiled-coil loop (residues 1–19), a catalytic domain (residues 20–173) and a globular C-terminal domain (residues 174–255, Figure S4). The closest structural homologue of AmpDh3 is the zinc protease AmpDh2, also from *P. aeruginosa* (Figure S5). The significant difference that stands out between the two enzymes is the conformations of the N-terminal regions and the presence of an extra helix (α_2) in the AmpDh3 structure (Figure S5). An L-shaped active site defines a ~ 22 Å-long peptide-stem binding segment and a ~ 26 Å-long extended binding site for the sugar backbone. The catalytic zinc ion is sequestered between the two binding sites (Figure S4). The pentapeptide product of hydrolysis of the synthetic substrate **22** by AmpDh3 is found in the complex in all four monomers, with the sole exception that the terminal D-Ala is not seen in the density, with the implication that it is mobile. The saccharide product (three of the four sugar rings were seen) was found bound, mapping out the saccharide-binding surfaces of the tetramer (Figures 3, S4, and S6). It is known that AmpDh3 can hydrolyze both the cell wall and the 1,6-anhydroMur-containing mucopeptides, with strong preference for the former.⁵ The complexes AmpDh3:**22** (Figures S4 and S6)

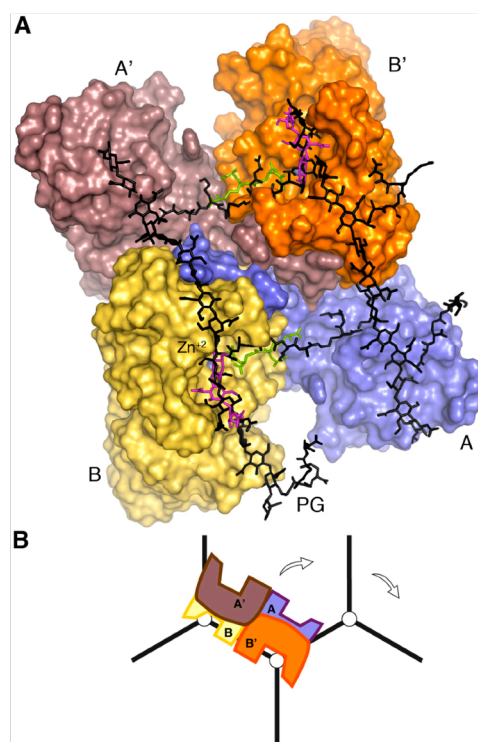


Figure 3. (A) Tetrameric X-ray structure of AmpDh3 in complex with the reaction products for turnover of **22**. Each subunit is colored differently to show the embrace by the four in the middle of the tetramer. The reaction products seen in the crystal structure are shown for monomers B and B', whose active sites are facing the viewer (the peptide stems in green and the saccharides in magenta). The other two active sites are on the opposite side of the tetramer. The NMR-based structure of the cross-linked peptidoglycan (in black) is superimposed on the coordinates for the products from the X-ray structure. (B) A cartoon for the complex showing the perspective down the axis of the peptidoglycan saccharide backbone (shown in open circles; viewed from 12 o'clock down in panel A). The peptides are shown symbolically as black lines. The three-fold symmetry for the peptidoglycan is shown down the axis of the saccharide backbones. The processivity of the action of AmpDh3 tetramer is shown by the arrows, as the pivoting of the enzyme on the saccharide backbone takes it to the next sites of reaction on the opposite face of the tetramer.

and AmpDh3:**23** (Figure S7) support these observations. The difference between the apo enzyme and the complexes is in the $\beta 5$ - $\beta 6$ protrusion, where the sugar backbone is accommodated (Figure S8).

Notwithstanding the monomer similarities of AmpDh2 and AmpDh3, they exhibit profound differences in the quaternary structures. The former is a dimeric protein that anchors to the membrane through its N-terminus, yet the latter is a soluble tetramer. A strong network of interactions in the AmpDh3 N-terminal coiled-coil loop (Figure S9) links the four monomers together. These distinct quaternary structures determine the unique activities of AmpDh2 and AmpDh3, notwithstanding the fact that they both hydrolyze the stem peptide from the peptidoglycan. The AmpDh3 structure exhibits an excellent accommodation of the solution structure of the peptidoglycan, which we solved recently by NMR.¹³ The 3D structure of the

peptidoglycan exhibits a right-handed helical arrangement for the sugar backbone, which sequesters the stem peptides at 120° of each other, a three-fold symmetry. If we map this 3D structure onto the X-ray structure of the tetramer of AmpDh3, two backbones of the saccharide chains coincide precisely with the X-ray positions for the bound sugars, simultaneously with overlapping of the cross-linked peptides with those seen for peptides in the X-ray structure (Figure 3A). This is an extended surface for binding of both the peptide and the saccharide segments. The two active sites on one side of the tetramer can perform catalysis on two peptidoglycan strands. The conformation for the solution NMR structure of the peptidoglycan¹³ does not allow occupation of all four active sites simultaneously. On completion of the reaction with the two bound peptidoglycans, the tetramer would release the product strands, and by a rotation of 60° the two active sites on the opposite side of the tetramer will be aligned to engage two neighboring strands for additional catalysis in a processive manner (Figure 3B). The 3D arrangements are entirely consistent and coincident with the three-fold symmetry of the peptidoglycan backbone and the spatial disposition of the pendant stem peptides. Furthermore, this model explains the existence of the majority of the product sites for AmpDh3 in the insoluble polymeric sacculus fraction, to which the AmpDh3 tetramer latches on.

AmpDh2, as indicated earlier, is sequestered on the inner leaflet of the outer membrane as a dimer. This positioning regulates its activity. It operates on the peripheries of the peptidoglycan, whereby its products are largely found in the soluble product fraction (released from the polymeric entity; Table 1). Its specific activity is lower, and it would appear to exhibit selectivity in its reaction, as it shows the presence of a significant partially turned over peptidoglycan (cuts one side of the cross-linked stem peptide). The contrary is true for AmpDh3. This enzyme is soluble, has higher specific activity, and does not leave behind partially hydrolyzed peptidoglycan. We do not know presently how its activity is regulated. However, likely as a function of the tetrameric structure, AmpDh3 anchors to the peptidoglycan itself in a multivalent manner (Figure 3A). This multivalency of interaction, in conjunction with two active sites on either side of the tetrameric structure, allows for the processive sequence of reactions that limits the activity of AmpDh3 primarily to the larger insoluble polymeric sacculus (Table 1). What is clear from our experiments is that AmpDh2 and AmpDh3 complement each other in the turnover and/or maturation of the cell wall.

■ ASSOCIATED CONTENT

■ Supporting Information

Crystallographic coordinates are deposited in the Protein Data Bank (PDB codes 4bxj, 4bxd, and 4bxg for AmpDh3 and AmpDh3:22 and AmpDh3:23 complexes, respectively) and experimental details. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

mobashery@nd.edu; xjuan@iqfr.csic.es

Author Contributions

^{||}These authors contributed equally.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a grant from the U.S. National Institutes of Health (GM61629) and by grants BFU2011-25326 (the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness) and S2010/BMD-2457 (the Government of Community of Madrid). The Mass Spectrometry & Proteomics Facility of the University of Notre Dame is supported by grant from the U.S. National Science Foundation (CHE0741793).

■ REFERENCES

- (1) (a) Litzinger, S.; Mayer, C. The Murein Sacculus. In *Prokaryotic Cell Wall Compounds*, König, H., Claus, H., Varma, A., Eds.; Springer: Berlin, 2010; pp 3–52. (b) Suvorov, M.; Fisher, J. F.; Mobashery, S. Bacterial Cell Wall: Morphology and Biochemistry. In *Practical Handbook of Microbiology*, 2nd ed.; Goldman, E., Green, L. H., Eds.; CRC Press: Boca Raton, 2009.
- (2) (a) von Nussbaum, F.; Brands, M.; Hinzen, B.; Weigand, S.; Häbich, D. *Angew. Chem., Int. Ed.* **2006**, *45*, 5072. (b) Green, D. W. *Expert Opin. Ther. Targets* **2002**, *6*, 1.
- (3) (a) Johnson, J. W.; Fisher, J. F.; Mobashery, S. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **2013**, *1277*, 54. (b) Park, J. T.; Uehara, T. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2008**, *72*, 211.
- (4) Boudreau, M. A.; Fisher, J. F.; Mobashery, S. *Biochemistry* **2012**, *51*, 2974.
- (5) Zhang, W.; Lee, M.; Heseck, D.; Lastochkin, E.; Boggess, B.; Mobashery, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 4950.
- (6) Martínez-Caballero, S.; Lee, M.; Artola-Recolons, C.; Carrasco-López, C.; Heseck, D.; Spink, E.; Lastochkin, E.; Zhang, W.; Hellman, L. M.; Boggess, B.; Mobashery, S.; Hermoso, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 10318.
- (7) Juan, C.; Moya, B.; Perez, J. L.; Oliver, A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 1780.
- (8) Moya, B.; Juan, C.; Alberti, S.; Perez, J. L.; Oliver, A. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 3694.
- (9) Lee, M.; Heseck, D.; Llarrull, L. I.; Lastochkin, E.; Pi, H.; Boggess, B.; Mobashery, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 3311.
- (10) Schuck, P.; Perugini, M. A.; Gonzales, N. R.; Howlett, G. J.; Schubert, D. *Biophys. J.* **2002**, *82*, 1096.
- (11) Lee, M.; Heseck, D.; Shah, I. M.; Oliver, A. G.; Dworkin, J.; Mobashery, S. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2525.
- (12) Lee, M.; Zhang, W.; Heseck, D.; Noll, B. C.; Boggess, B.; Mobashery, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8742.
- (13) Meroueh, S. O.; Bencze, K. Z.; Heseck, D.; Lee, M.; Fisher, J. F.; Stemmler, T. L.; Mobashery, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2006**, *103*, 4404.

7.3. INFORMACIÓN ADICIONAL

SUPPORTING INFORMATION.

Experimental Procedures.

Reaction of AmpDh3 with the predigested bacterial sacculus by MltE. The preparations of sacculus and AmpDh3 of *Pseudomonas aeruginosa* were given previously^{1, 2}. The sacculus preparation and MltE in 10 mM Tris-maleate, pH 6.8 were incubated at 30 °C for 4 h. The reaction mixture was boiled for 3 min, concentrated to dryness, and reconstituted in 20 mM phosphate buffer, pH 8.0. AmpDh3 was added and the resulting mixture was incubated at 37 °C for 4 h. The mixture was boiled for 3 min and was concentrated to dryness. The residue was taken up into borate buffer (pH 9.0) and sodium borohydride was added. After 40 min, the reduction reaction was quenched by addition of formic acid and the resulting suspension was centrifuged. The supernatant was separated and was used for analysis by LC/MS or LC/MS/MS.

Reaction of AmpDh3 with the intact sacculus, followed by mutanolysin. The AmpDh3 was incubated with the intact sacculus in 20 mM phosphate buffer, pH 8.0 for 18 h at 37 °C. The mixture was boiled for 3 min, was centrifuged, and was separated to supernatant and pellet. The supernatant and the pellet were separately treated with mutanolysin (purchased from Sigma-Aldrich). After an 18-h incubation at 37 °C, the reaction was quenched and was reduced by the sodium borohydride as described above. The supernatant was separated and was used for LC/MS or LC/MS/MS analyses

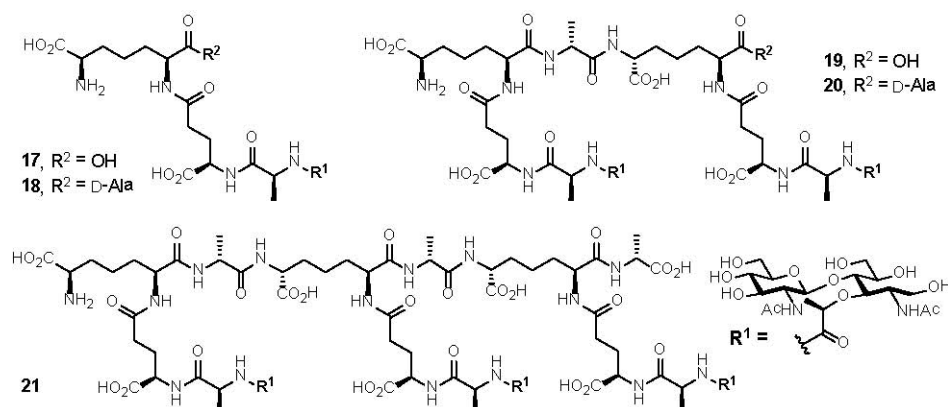


Chart S1. The chemical structures of the five abundant products from mutanolysin reaction with sacculus.

Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. LC/MS and LC/MS/MS methods were as described previously³. LC/MS/MS of AmpDh3 reaction products and comparison to synthetic compound **16** are given in Figures S1. Synthetic compound **16** was prepared according to literature procedure², starting from D-glucosamine. It has a very similar structure (containing NAG-NAM-NAG-NAM) to AmpDh3 products, therefore, its fragmentation pattern provided general information of LC/MS/MS fragmentation of this type of molecule.

Sedimentation Velocity (SV)/ Sedimentation Equilibrium (SE) Experiments. Sedimentation Experiments of AmpDh3 were performed by the general methods described earlier.² The SV and SE data for AmpDh3 are shown in Figures S2. The SV data for the mixed AmpDh2-AmpDh3 samples are shown in Figure S3. This experiment was performed to explore if the two enzymes formed a larger supramolecular structure, which ultimately was not seen.

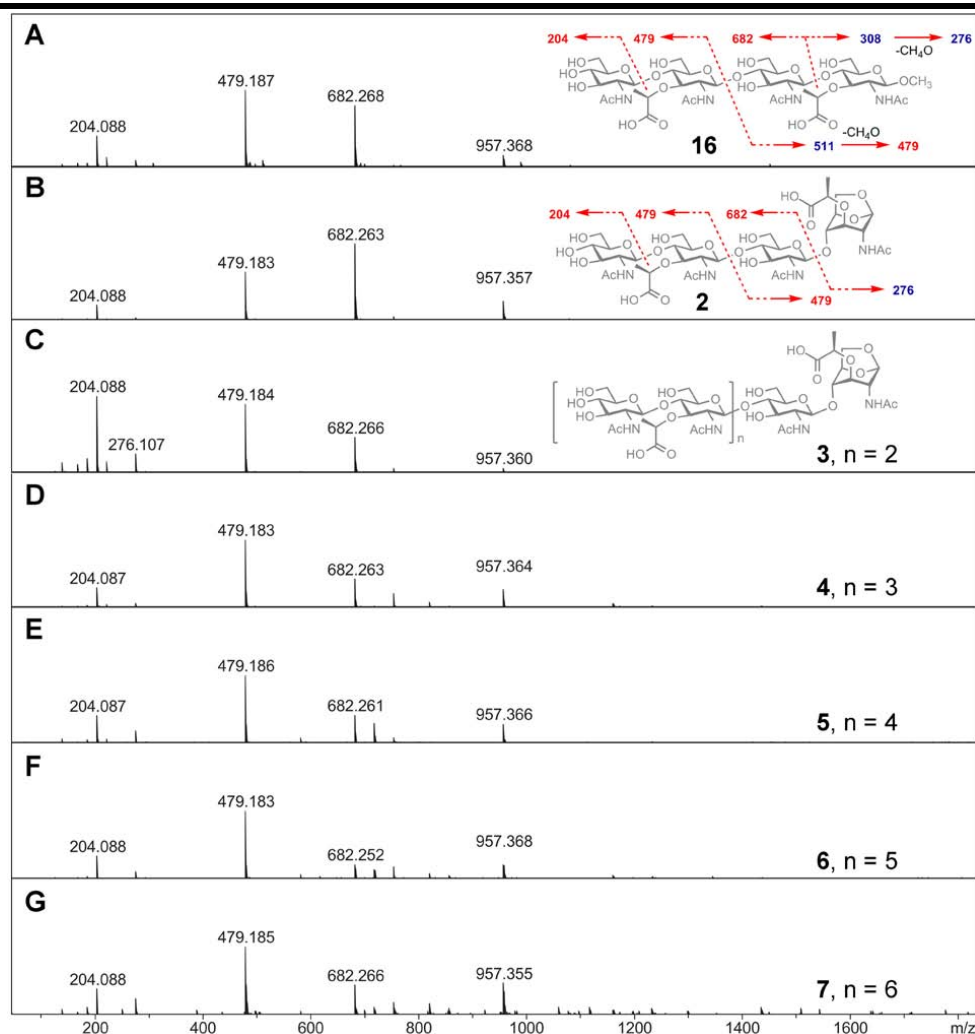


Figure S1. CID mass spectra of protonated synthetic compound **16** (A) and reaction products of AmpDh3, **2** (B), **3** (C), **4** (D), **5** (E), **6** (F), and **7** (G). Blue bars in panel A mark the peaks revealing the loss of neutral CH_4O fragment, corresponding to the loss of the methoxy group. Compound **16** has three major fragment ions in its CID mass spectrum (in panel A) represented by peaks at m/z 682.268, m/z 479.187, and m/z 204.088. The peaks represent masses of one, two and three sugars. Figure S1 (B-E) shows the CID mass spectrum of six products. These tandem mass spectra look very similar to that of the synthetic sample **16**. Even the largest compound **7** (with nominal mass of 3348.266) does not show high mass product ions. The CID mass spectrum of AmpDh3 products mainly showed peaks for product ions originated from smaller sugars such as one, two, three, and four linear saccharide units. Thus, we conclude that the products of AmpDh3 have a linear oligomeric sugar structure with a repeating unit of NAG-NAM.

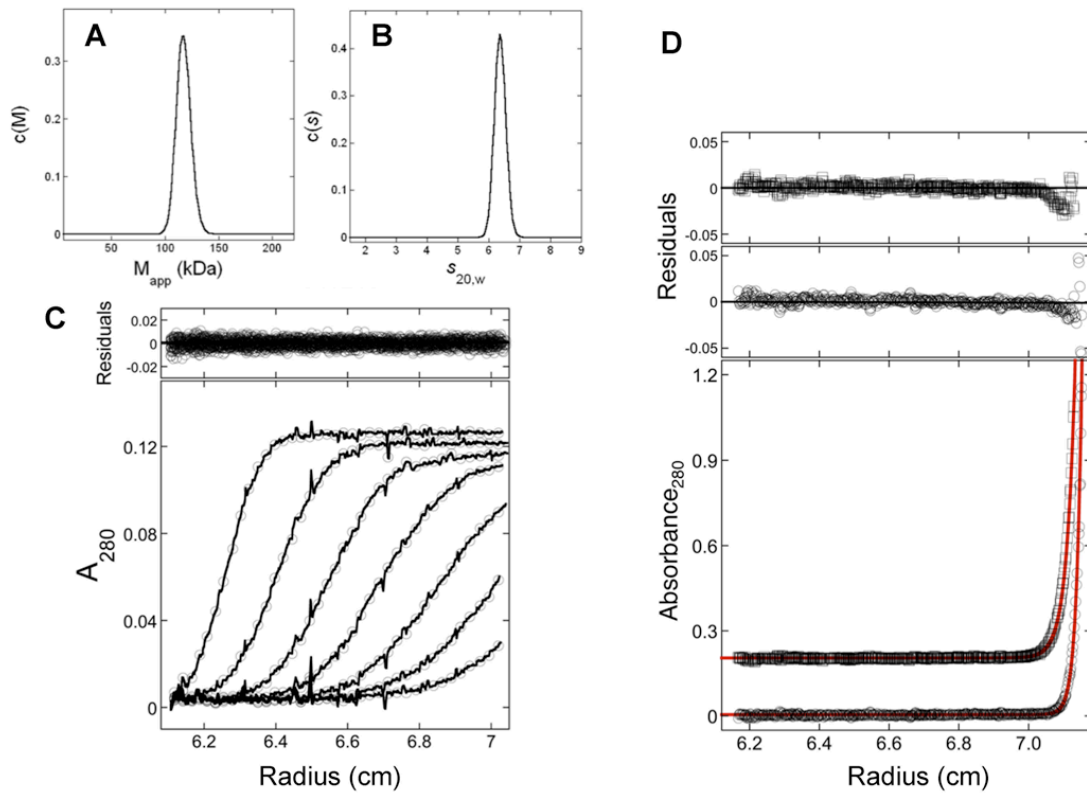


Figure S2. Sedimentation velocity and sedimentation equilibrium experiments. AmpDh3 (4.9 μ M) in 20 mM sodium phosphate, 0.1 M sodium chloride, pH 7.1 at 25,000 rpm at 4 °C. (A) Apparent molecular weights calculated for AmpDh3 sample under the above conditions. (B) s values converted to $s_{20,w}$ values for AmpDh3 sample under above conditions. (C) The experimentally obtained data fit to the Lamm equation using SEDFIT⁴ and above, the residual values of the fitted data. (D) Plot shows a sample of experimentally obtained sedimentation equilibrium data of AmpDh3 at 20,000 rpm (open squares) and 25,000 rpm (open circles) at 4 °C. Data for both rotor speeds was fit to equation 1 (below) the residual values of the fitted data are shown above the plot (data collected at 20,000 rpm was offset on the y axis for visual clarity). Equation 1: (1), $A(r) = \alpha_n \exp [\sigma_n (r^2 - r_o^2)] + \zeta$ (1). $A(r)$ is the absorbance at radial position r , α_n is the absorbance of protein (n) at r_o , ζ is the baseline offset and σ_n is the effective reduced molecular weight.

The SV data for the mixed AmpDh2-AmpDh3 sample was fit the same way as the AmpDh3 sample with two peaks being observed (Figure S3A). The peak with $M_{app} = 57,000 \pm 5000$ (Figure S3A) and $s_{20,w} = 3.92 \pm 0.24$ (Figure S3B) was assigned to the AmpDh2 dimer and the values obtained compared well with the previously reported value for this species.² The peak with $M_{app} = 113,000 \pm 7000$ (Figure S3A) and $s_{20,w} = 6.21 \pm 0.26$ (Figure S3B) corresponded with the tetrameric AmpDh3 species observed previously (Figure S2). The presence of the AmpDh2 dimer and AmpDh3 tetramer as distinct separate entities in the mixed sample and the absence of any higher order oligomeric species indicate that there is no interaction between AmpDh2 and AmpDh3 under these conditions.

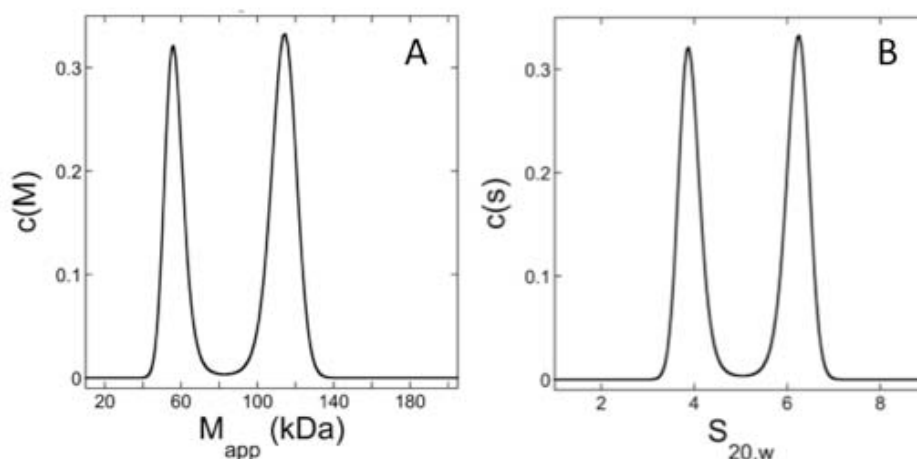


Figure S3. Sedimentation velocity experiments: AmpDh2 (3.1 μ M) and AmpDh3 (4.9 μ M) in 20 mM sodium phosphate, 0.1 M sodium chloride, pH 7.1 at 25,000 rpm at 4 °C. (A) Apparent molecular weights calculated for the AmpDh2-AmpDh3 sample under the above conditions. (B) The s values converted to $s_{20,w}$ values for the AmpDh2-AmpDh3 sample under above conditions.

Crystallization The purified AmpDh3, concentrated to 11 mg/mL (in PBS pH 7.0), was used to set up the initial crystallization trials at 291 K using the sitting-drop vapor-diffusion method. Good quality crystals were grown in 100 mM sodium acetate pH 4.6, 100 mM calcium chloride and 30% PEG 400. The mixture consisted of equal volumes of protein and precipitant solution (1 μ L) and equilibrated against 500 μ L of the reservoir solution. The mother liquor of the crystals was a cryoprotectant solution and was directly flash cooled at 100 K. The complex of AmpDh3 with compound **22** (AmpDh3:**22** complex) was obtained by soaking native crystals in a 20 mM solution of compound **22** mixed with the crystallization condition (100 mM sodium acetate pH 4.6, 100 mM calcium chloride and 30% PEG 400). The complex of AmpDh3 with compound **23** (AmpDh3:**23** complex) was obtained by soaking native crystals in a 20 mM solution of compound **23** mixed with the crystallization condition.

Data collection and processing. X-ray diffraction data set for AmpDh3 crystal comprised 720 images with a 0.5° oscillation and 2.35 Å resolution and were collected on beamline PX at the Swiss Light Source (SLS) Villigen, Switzerland. The data set was processed using XDS⁵ and scaled using SCALA from CCP4⁶ program suite. AmpDh3 crystallized in space group $P4_12_12$, with unit cell parameters $a = b = 101.80$, $c = 164.47$ Å. For the AmpDh3:**22** complex a complete X-ray diffraction data set was collected using synchrotron radiation source at the ESRF (Grenoble, France) in beamline ID29, using a Pilatus 6M detector and fixed wavelength of 0.9716 Å. Collected images were indexed, integrated and scaled using XDS,⁵ and IMOSFLM and SCALA from CCP4 package.⁶ Crystals of AmpDh3:**22** complex belonged to the space group $P4_12_12$ with cell dimensions of $a = b = 101.18$ Å, $c = 162.26$ Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$, and two monomers in the asymmetric unit. For the AmpDh3:**23** complex a complete X-ray diffraction data set was collected using synchrotron radiation source at the ESRF (Grenoble, France), beamline ID23-2 using a MarCCD detector and fixed wavelength of 0.8729 Å. Collected images were indexed, integrated and scaled using IMOSFLM and SCALA. Crystals of AmpDh3:**23** complex belonged to the space group $P4_12_12$ with cell dimensions of $a = b = 100.94$ Å, $c = 165.25$ Å, $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$, and two monomers in the asymmetric unit.

Structure determination and refinement. The AmpDh3 structure was determined by the Molecular Replacement method using the coordinates of AmpDh2 from *P. aeruginosa* (PDB entry 4bj4)² as a search model. The rotational and translational searches were performed with the program Phaser from CCP4.⁶ The model was manually completed using Coot⁷ and was refined with PHENIX.⁸ The R_{work} converged to 0.21 and the R_{free} to 0.26 in the final model. A summary of the refinement statistics is given in Table S1. The complex AmpDh3:22 was solved at 3.1 Å resolution using the Molecular Replacement method with the native AmpDh3 structure using MOLREP.⁹ The initial model was refined using PHENIX.⁸ Final values for R_{work} and R_{free} are 0.22 and 0.27, respectively. For AmpDh3:22, the rmsd value for the C α compared to the native structure is 0.620 Å for chain A and 0.624 Å for chain B. The complex AmpDh3:23 was solved at 2.95 Å resolution by the Molecular Replacement method with MOLREP and refined with PHENIX. Final values for R_{work} and R_{free} are 0.20 and 0.26 respectively. There is almost no difference between the structure of the native protein and the one with the complex. For AmpDh3:23, the rmsd value for the C α compared to the native structure is 0.168 Å for chain A and 0.164 Å for chain B. All of the amino-acid residues in the structure fit perfectly in the Ramachandran plot. Data refinement results are summarized in Table S1.

Table S1. Data collection and refinement statistics*

	AmpDh3	AmpDh3:22 complex	AmpDh3:23 complex
Diffraction data statistics			
Wavelength (Å)	1.00002	0.9716	0.8729
Space group	P41212	P41212	P41212
a, b, c (Å)	101.80, 164.47	101.19, 162.26	100.94, 165.25
$\alpha = \beta = \gamma$	90	90	90
Resolution range (Å)	48.63-2.35 (2.48-2.35)	48.3-3.1 (3.27-3.1)	48.35-2.95 (3.11-2.95)
Unique reflections	36822 (5286)	15988 (2289)	18710 (2671)
Completeness (%)	100 (100)	100 (100)	100.0 (100.0)
Redundancy	4.7 (3.6)	10.8 (8.0)	10.7 (10.4)
Rmerge	0.01 (0.09)	0.08 (0.25)	0.17 (0.82)
Average I/ σ (I)	42.6 (5.8)	21.8 (7.6)	16.6 (3.1)
Refinement statistics			
Resolution range (Å)	48.63-2.35 (2.48-2.35)	48.3-3.1 (3.27-3.1)	48.35-2.95 (3.11-2.95)
Rwork/Rfree	0.21/0.26	0.22/0.27	0.20/0.26
No. Atoms			
Protein	4077	4133	4072
Water	236	38	81
Ligand	-	90	140
B-factor (Å²)			
Protein	42.32	34.60	40.30
Water	39.91	20.8	23.0
Ligand	-	72.9	58.9
R.m.s. deviations			
Bond length (Å)	0.008	0.027	0.013
Bond angles (°)	1.18	2.02	1.33
Ramachandran	96.0/0.2	87.0/0.2	92.0/0.4
Favored/outliers (%)			

*Values between parentheses correspond to the highest resolution shells

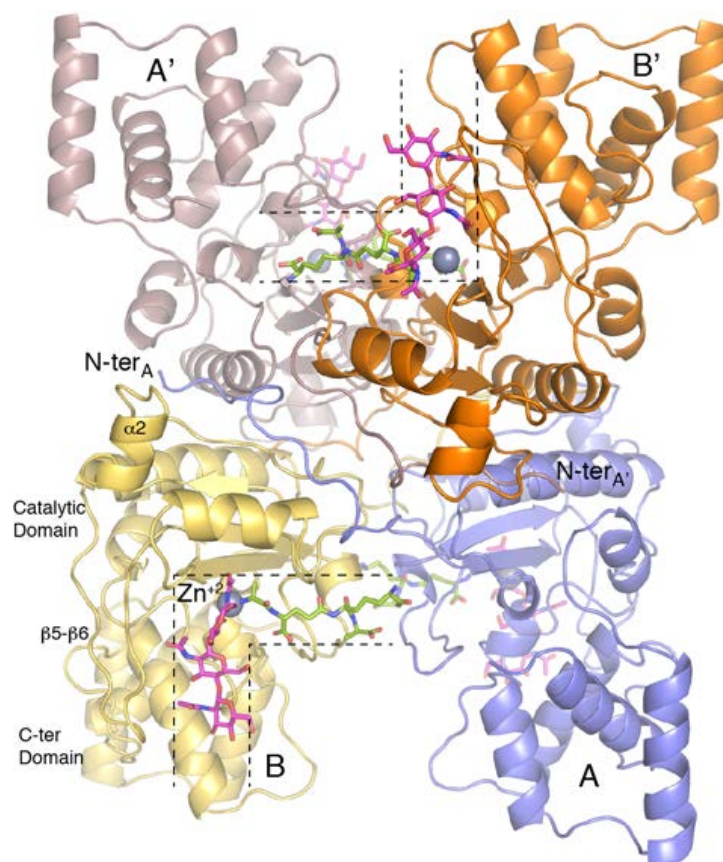


Figure S4. The tetrameric structure of AmpDh3 in complex with the reaction products of turnover of **22**. Monomers A (blue), B (yellow), A' (brown) and B' (orange) are color-coded. The active sites for monomer B and B' are indicated with the dotted black lines, with the active sites for the monomer A and A' located on the opposite side from the perspective. The catalytic zinc ions are shown as grey spheres.

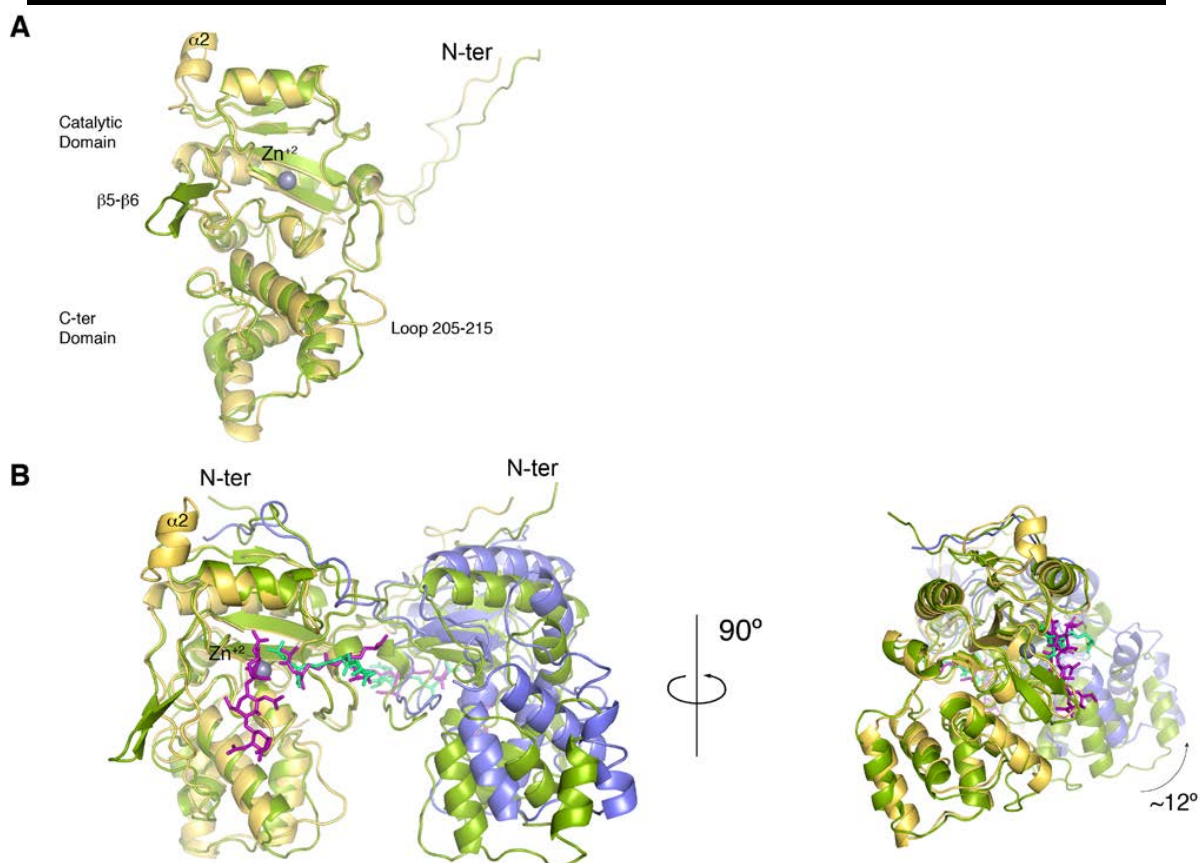


Figure S5. Structural comparison between AmpDh3 and AmpDh2. (A) Comparison between AmpDh3 monomer (yellow) and AmpDh2 monomer (green). The closest structural homolog of AmpDh3 is AmpDh2 from *P. aeruginosa* (RMSD of 0.966 Å for 178 Cα atoms). AmpDh3 possesses an extra-helix ($\alpha 2$) compared with AmpDh2. Structural differences are also concentrated in the N-terminal segment, the $\beta 5$ - $\beta 6$ protrusion and the loop 205-215. (B) Different dimer arrangement in AmpDh2 and in AmpDh3. The AmpDh2:tetrapeptide complex (PDB code 4bol, green)² and the asymmetric unit of the AmpDh3:22 complex (this manuscript, chain A is coloured in yellow and chain B in blue) is superimposed. In AmpDh3 the asymmetric unit contains a dimer, but AmpDh3 forms a tetramer with two symmetry-related molecules. The tetrapeptide product found in the AmpDh2:tetrapeptide complex is drawn as green sticks and the saccharide and peptide products found in the AmpDh3:22 complex are drawn as magenta sticks. Orientation of monomers in the AmpDh2 and AmpDh3 dimers are different by about 12° of rotation.

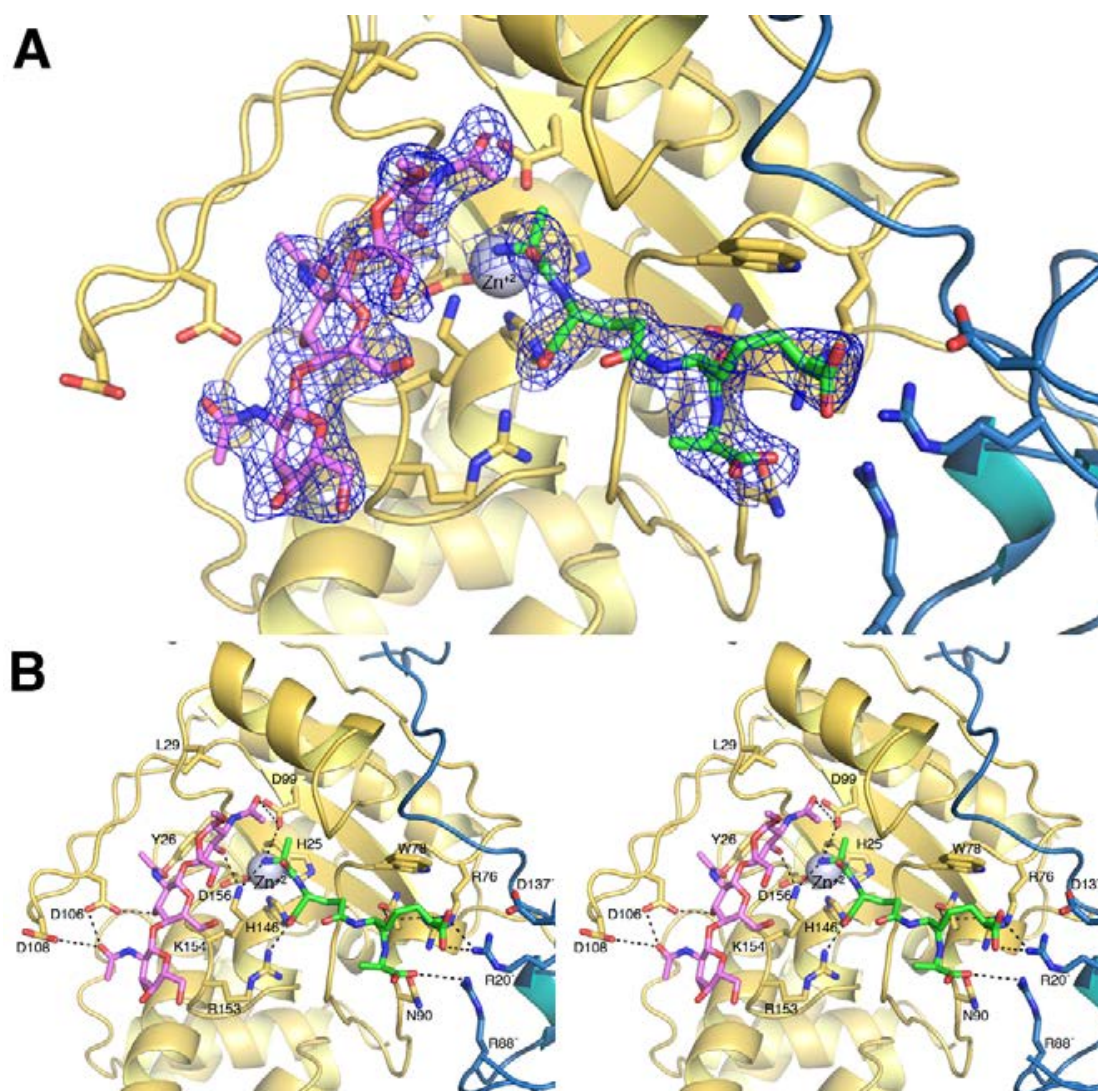


Figure S6. The crystal structure of AmpDh3:22 complex. (A) Electron density for the two reaction products (L-Ala-γ-D-Glu-*m*-DAP-D-Ala, green sticks) and (NAM-NAG-NAM, pink sticks) observed in the AmpDh3:22 complex. Electron density corresponds to the (2Fo-Fc) map contoured at 1σ. (B) Stereo view showing the interactions between AmpDh3 and the two reactions products in the AmpDh3:22 complex. The residues forming the active site are drawn in capped sticks. Carbon atoms of the glycan are in pink, peptide are in green, while those in the protein are color-coded as in panel A. Salt bridges and hydrogen bonds are shown as dashed lines.

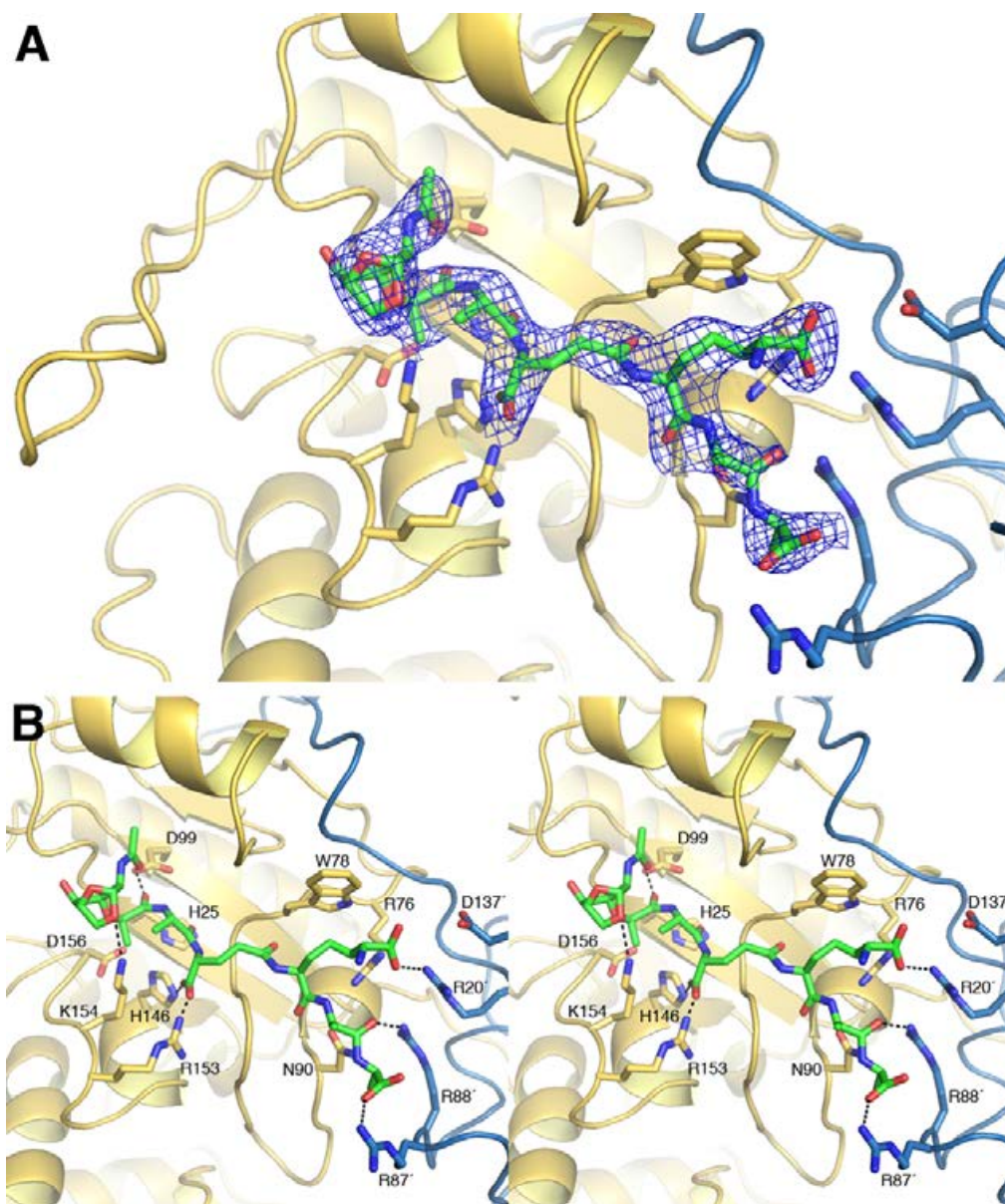


Figure S7. Crystal structure of AmpDh3:23 complex. (A) Electron density for the 1,6-anhydromuramyl pentapeptide **23** observed in the AmpDh3:23 complex. Electron density corresponds to the (2Fo-Fc) map contoured at 1.0 σ . (B) Stereo view showing the interactions between AmpDh3 and the bound 1,6-anhydromuramyl pentapeptide in the AmpDh3:23 complex. Carbon atoms of **23** are in green, and those in the protein are color-coded as in Figure S4 (monomer A in blue and monomer B in yellow). Salt bridges and hydrogen bonds are shown as dashed lines.

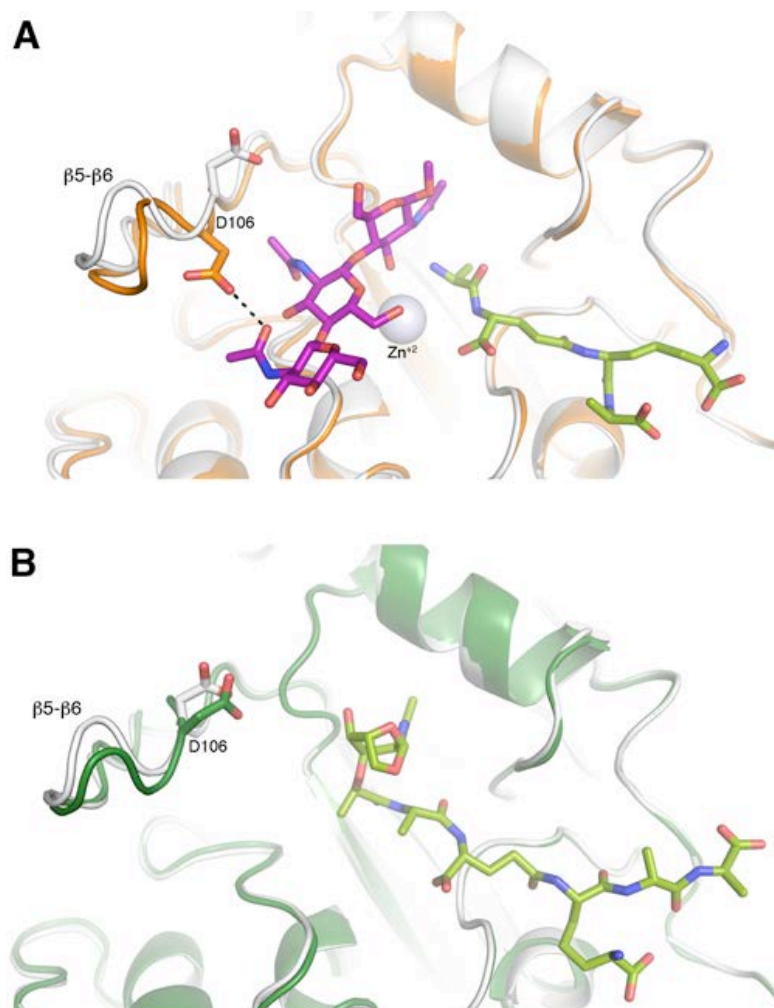


Figure S8. Structural comparison between apo AmpDh3 and complexed AmpDh3. (A) Comparison between AmpDh3 wild-type (grey) and AmpDh3:22 (ribbon in orange, the peptide stem in green sticks and the saccharides in magenta sticks). Changes are observed in the backbone of the $\beta 5$ - $\beta 6$ protrusion. The Asp106 residue experiences strong changes in its conformation to interact with the glycan chain. (B) Comparison between apo AmpDh3 (grey) and AmpDh3:23 complex (green). The catalytic zinc ion was not observed in the structure (very likely related with acid pH (pH 4.5) of the crystallization condition) resulting in the lack of hydrolysis of the compound 23.

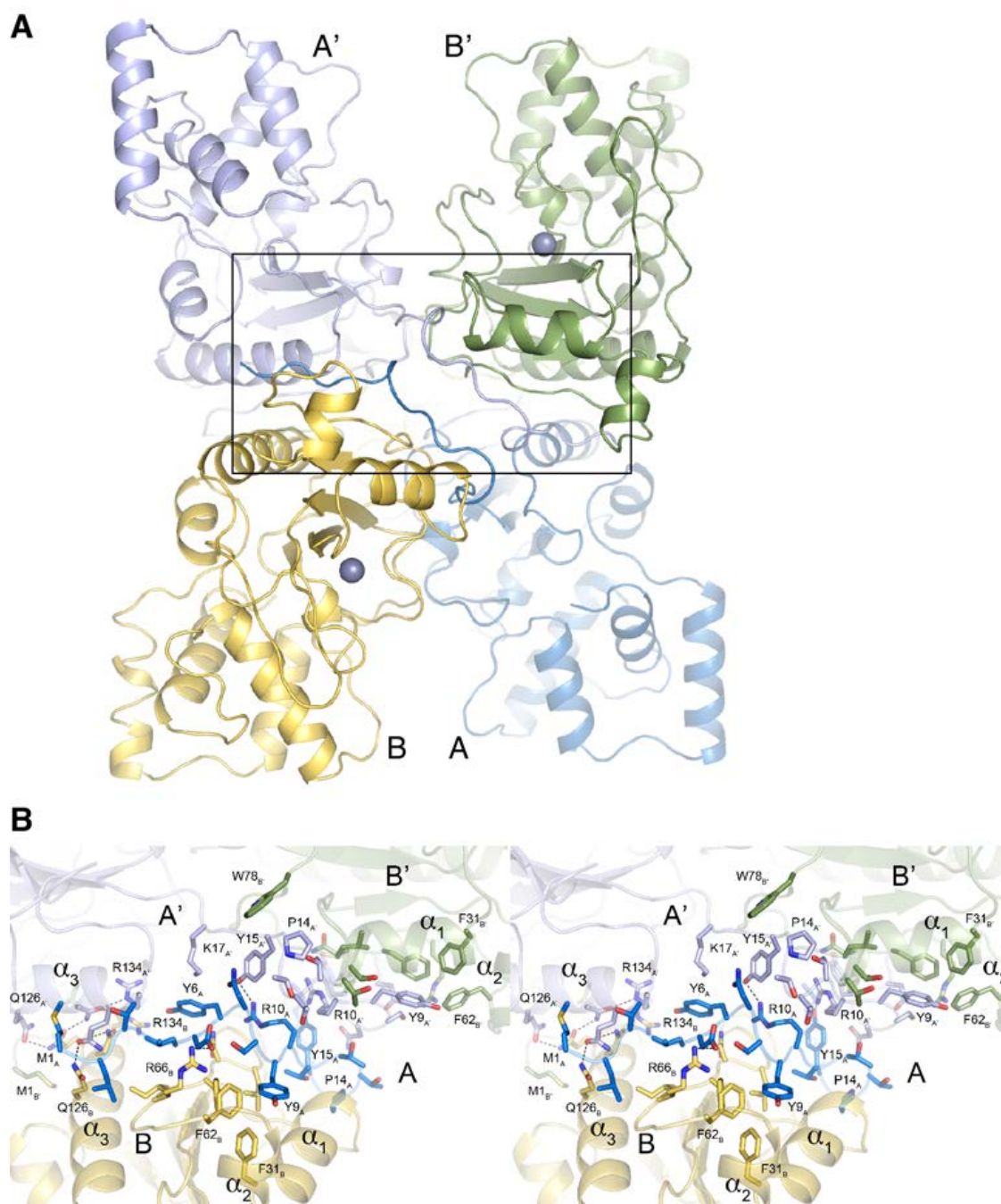


Figure S9. The AmpDh3 quaternary structure. (A) General disposition of the monomers within the tetramer of AmpDh3. The arrangement of the AmpDh3 tetramer, is defined by numerous polar, hydrophobic and cation- π interactions. These interactions are concentrated in the regions defined by the N-terminus, and the α -helix 2 and 3 of each monomer (within the marked rectangle). (B) Stereo view showing a detail of the interactions involved in tetramer formation. Salt bridges and hydrogen bonds are shown as dashed lines. These interactions are symmetrically distributed, so each interaction is repeated four times.

References:

1. Zhang, W.; Lee, M.; Heseck, D.; Lastochkin, E.; Boggess, B.; Mobashery, S. J. Am. Chem. Soc. 2013, 135, 4950-4953.
2. Martínez-Caballero, S.; Lee, M.; Artola-Recolons, C.; Carrasco-López, C.; Heseck, D.; Spink, E.; Lastochkin, E.; Zhang, W.; Hellman, L. M.; Boggess, B.; Mobashery, S.; Hermoso, J. A. J. Am. Chem. Soc. 2013, 135, 10318-10321.
3. Lee, M.; Heseck, D.; Llarrull, L. I.; Lastochkin, E.; Pi, H.; Boggess, B.; Mobashery, S. J. Am. Chem. Soc. 2013, 135, 3311-3314.
4. Schuck, P.; Perugini, M. A.; Gonzales, N. R.; Howlett, G. J.; Schubert, D. Biophys. J. 2002, 82, 1096-1111.
5. Kabsch, W. Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 2010, D66, 125-132.
6. Collaborative Computational Project, N. Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 1994, D50, 760-763.
7. Emsley, P.; Cowtan, K. Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 2004, D60, 2126-2132.
8. Afonine, P. V.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Echols, N.; Headd, J. J.; Moriarty, N. W.; Mustyakimov, M.; Terwilliger, T. C.; Urzhumtsev, A.; Zwart, P. H.; Adams, P. D. Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 2012, 68, 352-367.
9. Vagin, A.; Teplyakov, A. J. Appl. Crystallogr. 1997, 30, 1022-1025.

7.4. DISCUSIÓN

Los productos de reacción de la incubación de AmpDh3 con el sáculo en su fase estacionaria han revelado que esta amidasa es capaz de acceder al interior de la pared celular para hidrolizar la parte peptídica de las cadenas de PG, independientemente de si éstas poseen enlaces cruzados o no. La mayoría de los productos de AmpDh3 son hidrólisis completas (93%), y sólo un 5% son productos parcialmente hidrolizados.

Al comparar los resultados de AmpDh3 con los obtenidos para AmpDh2, se observa que AmpDh3 es hasta tres veces más activa que AmpDh2 y, aunque ambas actúan sobre cadenas simples o cruzadas indistintamente, AmpDh3 es mucho más específica que AmpDh2. Además, la mayoría de los productos de AmpDh3 pertenecen a la fracción insoluble del sáculo, mientras que AmpDh2 obtiene sus productos en la fracción soluble.

Mediante la estructura cristalográfica de AmpDh3 se ha demostrado cómo actúa AmpDh3 dentro de la célula y se han podido explicar los productos obtenidos por esta enzima.

El homólogo estructural más cercano de AmpDh3 es AmpDh2. Experimentos de velocidad de sedimentación han demostrado que AmpDh3 es un tetrámero en solución, algo que también se ha visto en la estructura cristalográfica de la enzima. AmpDh3 también posee un extremo desordenado N-terminal (residuos 1-19), un dominio catalítico (residuos 20-173) y otro dominio globular en el extremo C-terminal (residuos 174-255). Al comparar las estructuras de AmpDh2 y AmpDh3, se observa que la segunda posee una hélice extra en el dominio catalítico (fundamental para la formación del tetrámero) y que existen diferencias en la zona desestructurada del extremo N-terminal, así como en la zona comprendida entre los residuos 205-215.

La unidad asimétrica de AmpDh3 está constituida por un dímero, al igual que en AmpDh2. En el caso de AmpDh3, la segunda molécula del dímero está rotada 12° respecto a su correspondiente en AmpDh2. Además, el dímero de AmpDh3 (moléculas A y B) está relacionado por simetría con otro dímero (moléculas A' y B'), formando en el cristal el tetrámero que ya se había observado en solución. La estructura cuaternaria se mantiene unida debido a las fuertes interacciones en la zona N-terminal de los cuatro monómeros.

Por tanto, la diferencia más importante entre AmpDh2 y AmpDh3 es que AmpDh2 es un dímero anclado a la membrana mientras que AmpDh3 forma un tetrámero en solución. A pesar de realizar la misma función (hidrolizar el péptido de la cadena de peptidoglicano), la diferencia en su estructura cuaternaria es lo que determina las actividades únicas de AmpDh2 y AmpDh3.

El sitio activo de AmpDh3 también tiene una forma de "L", con 22 Å para la parte peptídica y 26 Å para la parte glicánica, situando el átomo de zinc en el vértice de la "L". En este caso también se da una coordinación tetrahédrica típica del metal para una zinc proteasa, coordinado por la His25, His146, Asp156 y una molécula de agua.

Para intentar comprender el comportamiento de la proteína y los productos de reacción de la misma, se obtuvieron varios complejos.

La cristalización de AmpDh3 con el ligando tetrasacárido pentapéptido (complejo AmpDh3:22) demostró que la enzima es activa, ya que se observaron a la vez los dos productos de la hidrólisis del sustrato: el producto peptídico (Ala- γ -D-Glu-*m*-DAP-D-Ala-D-Ala) por una parte, y los cuatro azúcares de la cadena glicánica por otra. En el caso de AmpDh3 el sitio activo de unión del péptido también se extiende, igual que ocurre en AmpDh2, por lo que AmpDh3 podría hidrolizar el péptido tanto en las cadenas sencillas como en las cruzadas.

La diferencia entre la estructura de AmpDh3 en su forma apo y en complejo se da únicamente en la zona $\beta 5$ y $\beta 6$, que se tiene que acercar para acomodar los azúcares.

AmpDh3 se cristalizó también con un sustrato anhidro, el 1,6-anhidromurámico pentapéptido, sustrato propio de la amidasa citosólica AmpD, que quedó perfectamente estabilizado en el sitio activo de AmpDh3 (Complejo AmpDh3:23). A pesar de la menor afinidad de AmpDh3 por el sustrato anhidro, este complejo demostró que la enzima también puede catalizar sustratos de la AmpD citosólica. Sorprendentemente, el complejo se obtuvo en la forma inactiva de la proteína, es decir, sin hidrolizar. El ión catalítico Zn^{+2} no se observó en esta estructura, lo que podría deberse al pH ácido (4.5) de la condición de cristalización.

Los productos de reacción obtenidos tras incubar AmpDh3 con el sáculo y las estructuras cristalográficas han permitido proponer un mecanismo de reacción de la enzima.

La disposición tetramérica de AmpDh3 tiene los sitios activos “dos a dos” dirigidos a caras opuestas, lo que permite un mecanismo de hidrólisis procesivo. Al no estar anclada a la membrana, AmpDh3 se puede mover libremente por el periplasma y es capaz de introducirse en el interior del PG.

El modelo de “panal de abeja” del peptidoglicano posiciona los péptidos a unos 120° entre sí. La parte glicánica del PG encajaría con las posiciones asignadas al sitio de unión a azúcares en AmpDh3 en dos de las moléculas del tetrámero. De esta forma, los dos sitios activos que están dirigidos hacia la cadena de azúcares estarían hidrolizando el PG. Cuando la reacción de estas dos moléculas termina y los productos de reacción se liberan, el tetrámero giraría 60° para que los sitios activos de los otros dos monómeros quedasen alineados para hidrolizar a una cadena de PG vecina. Este modelo de “tuneladora” explicaría la mayoría de los productos de reacción de AmpDh3, así como la clara preferencia de esta enzima por la componente polimérica e insoluble de la pared celular. De hecho, AmpDh3 produce productos con más de 30 azúcares.

Así pues, las conclusiones fundamentales de este trabajo serían:

- Se han caracterizado los productos de la reacción de AmpDh3 sobre sáculos purificados.
- AmpDh3 presenta sitios específicos para el reconocimiento de la cadena glicánica y el brazo peptídico.
- El estado tetramérico de la enzima y su libre movimiento por el periplasma celular regularía su actividad, que sería capaz de hidrolizar el PG desde su interior, independientemente de que se trate de cadenas unidas o aisladas.
- AmpDh2 y AmpDh3 son enzimas complementarias en el remodelado de la pared en *Pseudomonas aeruginosa* y su localización celular es clave para el desarrollo de la actividad de ambas enzimas.

8. ARTÍCULO 5.

**X-Ray Structure, Reactions and Evidence for Processivity
in Catalysis by the Lytic Transglycosylase MltC of
Escherichia coli.**

Submitted

8.1. INTRODUCCIÓN A LA TRANSGLICOSILASA LÍTICA MltC Y APORTACIÓN DEL AUTOR.

Las transglucosilas líticas son las enzimas encargadas de comenzar el proceso de reciclaje de la pared celular, mediante la ruptura del enlace glicosídico β -1,4 entre los azúcares NAM-NAG del peptidoglicano. En este trabajo se presenta la estructura de una LT de *Escherichia coli* de la familia 1C.

MltC (350 residuos, 38,7 KDa) es una enzima anclada a la membrana, que comparte con el resto de su familia un dominio catalítico común. Sin embargo, las considerables diferencias estructurales entre todas las transglucosilasas líticas de *E. coli*, relacionadas no sólo con los distintos módulos catalíticos, sino también con la presencia de módulos estructurales de función desconocida, apuntan a la existencia de una función particular para cada LT.

Se ha abordado un extenso estudio genómico, estructural, de mutagénesis dirigida y de análisis por espectrometría de masas de los productos de la reacción de la MltC, que pretende dar información sobre los siguientes puntos:

- Dualidad de actividades exo- y endolíticas en MltC. MltC es una LT básicamente exolítica, sin embargo, experimentos con el sáculo han desvelado que esta enzima posee algo de actividad endolítica (0.5% del total) y es capaz de actuar sobre cadenas con enlaces entrecruzados.
- Mecanismo de anclaje de la enzima a la pared celular.
- Función del dominio adicional de MltC.
- Actividad y regulación de la proteína completa en el peptidoglicano. Implicaciones fisiológicas para la bacteria.

En esta publicación la autora de esta Tesis ha sido la encargada de cristalizar, resolver la estructura de la proteína nativa MltC y resolver los complejos de la enzima con tres ligandos diferentes. Con toda esta información se ha podido proponer un innovador mecanismo de acción para MltC que explicaría los productos de reacción obtenidos de forma experimental, así como su implicación *in vivo*.

8.2. PUBLICACIÓN

X-Ray Structure, Reactions and Evidence for Processivity in Catalysis by the Lytic Transglycosylase MltC of *Escherichia coli*

Cecilia Artola-Recolons,[§] Mijoon Lee,[#] Noelia Bernardo-García,[§] Blas Blázquez,[#] Dusan Hesek,[#] Sergio G. Bartual,[§] Kiran V. Mahasenan,[#] Elena Lastochkin,[#] Hualiang Pi,[#] Bill Boggess,[#] Kathrin Meindl,[‡] Isabel Usón,[‡] Jed F. Fisher,[#] Shahriar Mobashery*,[#] and Juan A. Hermoso*,[§]

[§]Department of Crystallography and Structural Biology, Inst. Química-Física “Rocasolano”, CSIC, Serrano 119, 28006 Madrid, Spain [#]Department of Chemistry and Biochemistry, Nieuwland Science Hall, Notre Dame, Indiana 46556, United States

[‡]Instituto de Biología Molecular de Barcelona, CSIC, Baldori Reixach 13, 08028 Barcelona, Spain, and ICREA (Institutio Catalana de Recerca y Estudis Avançats)

¹The first two authors contributed equally

Supporting Information Placeholder

ABSTRACT: The lytic transglycosylases are essential bacterial enzymes that catalyze the non-hydrolytic cleavage of the glycan strands of the bacterial cell wall. We describe here the structural and catalytic properties of MltC, one of the seven lytic transglycosylases found in the genome of the Gram-negative bacterium *Escherichia coli*. The high-resolution X-ray structure of a soluble construct of MltC shows a unique, compared to known lytic transglycosylase structures, two-domain structure characterized by an expansive active site of 53 Å length extending through an interface between the domains. The structures of three complexes of MltC with cell-wall analogues suggest the positioning of the peptidoglycan in the active site both as a substrate and as a product. One complex is suggested to correspond to an intermediate in the course of a processive mechanism for sequential and exolytic cleavage of the peptidoglycan. A designed mass spectrometry experiment provided evidence for this processivity in MltC catalysis. Moreover, MltC partitioned its reactive oxocarbenium-like intermediate between trapping by the C6-hydroxyl of the muramyl moiety (lytic transglycosylase activity, the major path) and by water (muraminidase activity). Genomic analysis identifies the presence of an MltC homologue in no less than 791 bacterial genomes. While the role of MltC in cell-wall assembly and maturation remains uncertain, we are compelled to conjecture a specific and central functional role for this enzyme, as befits the uniqueness of its two-domain structure

INTRODUCTION

A critical task for bacteria is the preservation of the integrity of their cell wall. This task summons numerous enzymes to simultaneously control the elongation, the remodeling, the puncture (to accommodate protein access to the exterior of the bacterium), and the cleavage of its cell wall following cell division. Just how critical this task is for the bacterium may be measured by the extensive ensemble of antibiotic classes that target both the cell-wall structure and the enzymes involved in its preservation (1). The bacterial cell wall (also known as the sacculus) is a complex crosslinked polymer of considerable complexity (2). Its building unit is the peptidoglycan, comprising a repeating disaccharide

N-acetylglucosamine-*N*-acetylmuramic acid (NAG-NAM) glycan strand, and a uniquely bacterial pentapeptide stem (in most Gram-negative bacteria: —L-Ala-D-g-Glu-meso-DAP-D-Ala-D-Ala, where DAP is the abbreviation for diaminopimelate) appended to the NAM saccharides. In the mature peptidoglycan, the glycan strands are crosslinked by a transpeptidation reaction, wherein one stem is joined to the free amine of the DAP residue of a neighboring stem.

Among the most enigmatic enzymes contributing to the cell-wall integrity of Gram-negative bacteria (including many pathogens such as *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp., *Helicobacter pylori*, and *Neisseria gonorrhoeae*) are the lytic transglycosylases (LTases). The LTases non-hydrolytically cleave the —NAM-NAG-glycosidic bond in an unusual reaction, wherein an oxocarbenium species is formed at the anomeric carbon of the NAM unit and is entrapped by the NAM C6-hydroxyl to cleave the glycan strand, as a 1,6-anhydromuramic terminus is formed (Figure 1). This deceptively simple reaction is implicated as a late step in cell-wall biosynthesis, as an event in peptidoglycan recycling, in second-messenger formation to control the expression of β -lactamases as antibiotic-resistance enzymes, in the release of peptidoglycan-derived pathogen-associated molecular patterns as a virulence mechanism, in peptidoglycan puncturing to accommodate multi-protein structures such as the anchoring of the flagella, and in cell division. The LTase family of *E. coli* is arguably the best studied and consists of seven enzymes (annotated as MltA, MltB, MltC, MltD, MltE, MltF, and Slt70). The first six are membrane-bound (to the inner leaflet of the outer membrane) while Slt70 is a soluble enzyme found within the periplasmic space (3). The number of LTases within each bacterial

species is variable, and as studied within the *E. coli* family, the activity of one can compensate for the loss of activity of others. Indeed, a viable *in vitro* planktonic *E. coli* phenotype is obtained following deletion of all of the LTases save MltF (but one is not obtained upon deletion of all seven) (4).

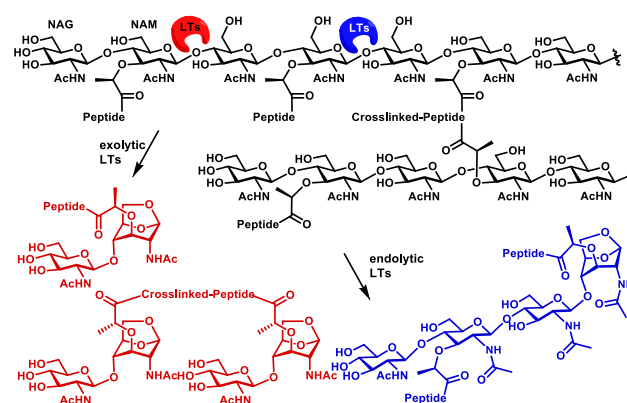


Figure 1. A sampling of reactions of LTases of *E. coli*.

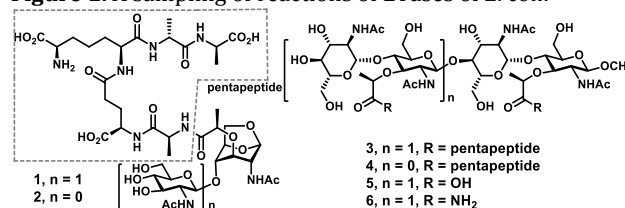


Chart 1. The six synthetic compounds used in the present study.

It is not simply this redundancy of function that has made the study of the LTases such a challenge (5). There is additionally the number of family members, the covalent attachment of most to the membrane, and the extraordinary difficulty of their enzymatic assay. Nonetheless, some measure of the function of each is now emerging from the combination of genomic and structural analyses, phenotype characterization upon genetic deletion, and the use of HPLC-MS analysis of the peptidoglycan fragments (muropeptides) obtained upon digestion of the whole peptidoglycan sacculus accomplished by each individual LTase family member. Evaluation of the *E. coli* family using this latter assay method has enabled initial assignments within the family of those LTases that preferentially perform endolytic (cleavage in the middle of the peptidoglycan) and exolytic (cleavage at the terminus) reactions (Figure 1), and as well those that show preference for the presence (or absence) of crosslinked stems (6). An understanding of the structural bases for these preferences is just now emerging. Notwithstanding strong structural conservation

within the catalytic domains of LTases of *E. coli*, an overall structural comparison of the X-ray structures for soluble constructs of MltA (7), MltB (8), MltE (9) and Slt70 (10) show each to be distinct. While the smallest protein is MltE (corresponding to the spare catalytic domain) the others have additional domains of unknown function(s) (3). Here we present the structure of a soluble construct of *E. coli* MltC. The two-domain MltC structure—an N-terminal structural domain and a C-terminal catalytic domain—is unique when compared to the structures of the four *E. coli* LTase solved previously. Moreover, emerging from these studies is a mechanistic understanding to explain processive catalysis by MltC, and a hypothesis for the functional role of the enzyme within the bacterium.

RESULTS

The *mltC* gene corresponding to amino acids 19–359 of the native enzyme was cloned. This construct excludes the cysteine residue (Cys17) that would be *S*-lipidated by transfer of the nascent protein to a phosphatidylglycerol molecule in the inner leaflet of the outer membrane. Cloning from residue 19 ensured a soluble recombinant protein, which was purified to homogeneity. The apo MltC was crystallized both as the wild type and as a catalytically impaired E217Q variant (used for crystallization of all complexes). Residue E217 is the required proton donor to the scissile glycosidic bond that leads to the reactive oxocarbenium species, hence its conservative mutation to glutamine abrogates its catalytic activity. These crystals were soaked with various synthetic peptidoglycan derivatives corresponding to both peptidoglycan substrate analogs and LTase reaction products (compounds 1–6; Figure 1B) (13, 14). Among these structures are three tetrasaccharides (compound 3 with peptide stems and compounds 5 and 6 without) as mimetics of the longer-chain peptidoglycan, and a product, compound 1. None of compounds 3–6 was a substrate for MltC. Hence, the minimum length for a substrate of this enzyme must be more than four saccharides. Four structures were solved: apo MltC (2.3 Å resolution), the MltC·1 complex (2.4 Å resolution), the MltC·5 complex (2.1 Å resolution), and the MltC·6 complex (2.9 Å resolution) (Table 1).

The asymmetric unit of each crystal contained two protein molecules, with each presenting nearly identical structures as assessed by a backbone root-mean-square deviation (rmsd) value of 0.36 Å. Each monomer (Figure 2) parses into a novel N-terminal domain (residues 30–182) and a catalytic

C-terminal domain (residues 183–359, showing the expected GH23 fold). As the MS analysis for the recombinant protein gives the expected mass value ($M_r = 38,495 \pm 4$; predicted mass of $M_r = 38,493$) for the amino-acid residues 19–259 construct, residues 19–29 are present but are not seen in the electron density due to disorder (as is also predicted by the DisEMBL server (<http://dis.embl.de/>)). The two domains are intimately linked (Figure 2) by extensive aromatic zipper (interdigitated aromatic side chains) and polar interactions (Figure S2) shared across an extended interface.

MltC from *E. coli* shares with three other *E. coli* LTases (Slt70, MltD and MltE) a classification as a Family 1 LTase based on sequence homology within their catalytic domains, and having (also with Family 3 and 4 LTases) sequence homology to the GH23 lysozyme family (11). Indeed, according to the Dali Server (12) the closest structural homologs of the catalytic domain of MltC are *E. coli* MltE (9) and the catalytic domain of *E. coli* Slt70 (Figure S1) (10). The N-terminal domain of MltC does not have any structural precedent.

A large substrate-binding site in MltC allows Endo- and Exolytic activities. Although not hydrolytic enzymes (but possessing a lysozyme fold), the LTase active site adopts the naming convention for hydrolytic enzymes, wherein the subsites flanking the scissile bond in the substrate are designated positions $-i$ (the “non-reducing” end), and through $+j$ in the opposite direction. The saccharide units immediately flanking the scissile glycosidic bond are designated as positions -1 (occupied by the NAM saccharide) and $+1$ (occupied by the NAG saccharide). As seen in the MltC·5 and MltC·6 complexes, the catalytic domain of MltC has an extended (approximately 23 Å in length) recognition site for the peptidoglycan backbone (Figure 2). Moreover, this expansive active site merges seamlessly into a second peptidoglycan-binding site found in the second domain, extending the active site by an additional ~30 Å. The contiguous concavity of the catalytic and of the N-terminal domains defines an extended groove (of approximately 53 Å total length) capable of accommodating at least nine saccharide residues (Figure 2A). The length of this groove implicates also an endolytic activity for MltC, as is indeed observed in reactions with the sacculus (6). The seat of the reaction is roughly in the middle of the extended peptidoglycan-binding groove.

Tetrasaccharide substrate analogs 5 and 6 gave two separate complexes (MltC·5 and MltC·6) each

occupying the -1 to -4 subsite positions (Figure 2A and Figure S3–S6). Compounds 5 and 6 are β -methyl glycosides and hence leave the $+1$ subsite (and beyond) unoccupied. The positions of 5 and 6 nearly superimpose in these complexes (Figure S7). The tetrasaccharides are stabilized by numerous polar interactions (Figure S5 and Figure S6), especially from residues R147, D244, R247, K314 and E341, and by three tyrosines (Y273, Y281 and Y299). The side-chain of the catalytic E217 in the wild-type enzyme has a hydrogen-bond interaction through one of its carboxylate oxygens with Tyr345, while the other oxygen is oriented to the glycosidic oxygen of the substrate surrogate (Figure S8). This interaction is what would be expected for the proton donor to the scissile glycosidic bond. In the inactive Q217 mutant, this interaction is altered slightly (Figure S8).

We have shown that MltC is primarily an exolytic enzyme, removing two saccharides from one terminus of the peptidoglycan with cleavage occurring between the -1 and $+1$ subsites (6). This exolytic reaction liberates disaccharide 1 as the product of each turnover (Figure 3A). The two products of the reaction occupy the -1 to -4 subsites (the larger peptidoglycan; “product I”) and subsites $+1$ and $+2$ (disaccharide 1; “product II”), respectively. We soaked crystals of the E217Q mutant with 1 (product II) and determined the X-ray structure of the resulting complex at 2.4-Å resolution. The affinity of 1 for the enzyme must be poor, as it did not bind at the $+1/+2$ subsites (Figure 2C). This result is explainable for efficient catalysis, as a high affinity for the subsites would result in product inhibition. Neither did we see 1 in the -1 and -2 subsites, where product I of the reaction would be located. However, the peptide density for compound 1 was seen with great clarity, with an absence of density for the disaccharide, indicative of mobility of the disaccharide segment within the complex (Figure S9).

The saccharide portion of the ligand was modeled computationally into the X-ray structure and the resulting complex was energy minimized. The position of the peptide stem necessitates occupation of the $+1$ subsite by the 1,6-anhydromuramyl moiety and of the -1 subsite by the *N*-acetylglucosamine (NAG) (Figure 2C and Figure S10). We verified experimentally that compound 1 is not a substrate for MltC, yet the saccharides in this compound straddle the -1 and $+1$ subsites in this complex. We assert that this complex is an intermediate state (Figure 3A) in translocation of “product I” forward for another

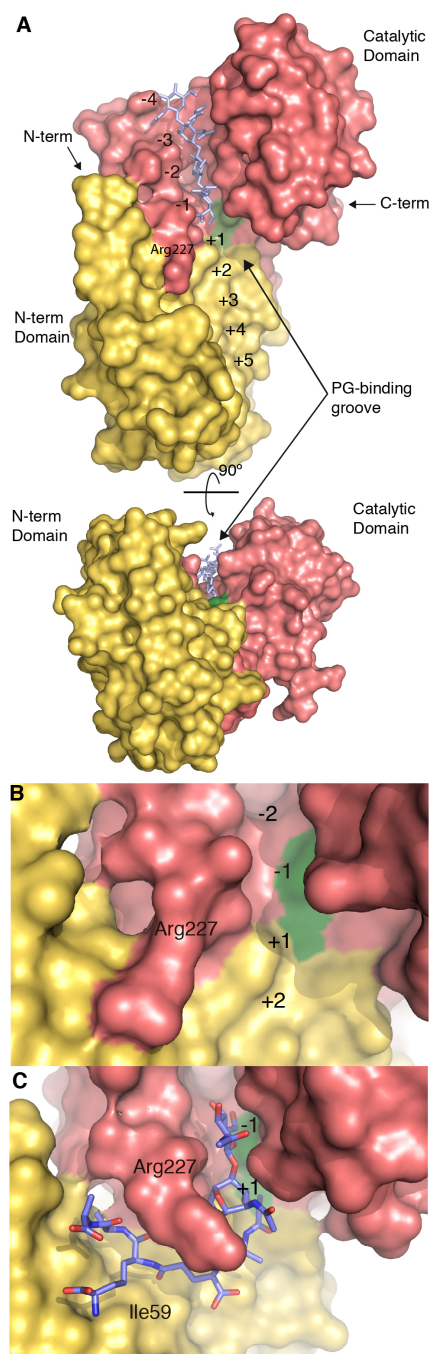


Figure 2. (A) Molecular surface representation of MltC in complex with tetrasaccharide 5. The N-terminal domain is colored in yellow and the catalytic domain in pink. The position of the catalytic E217 (Q217 in the complex) is in green. The tetrasaccharide 5 sequestered at the peptidoglycan-binding groove is represented in blue sticks. The N-terminus, the site of attachment of residues 19–29 and the fatty acyl membrane anchor, not seen in the electron density, is indicated by the arrow at 11 o'clock. (B) A close-up of the molecular surface of the seat of the catalytic reaction in apo MltC (C) and of MltC in complex with 1.

turnover event. The position of Arg227 in these complexes is of special interest with respect to turnover. The side chain of Arg227 aligns with subsites +1 and +2 and is flush against the protein surface in our two tetrasaccharide complexes and in the apo enzyme (Figure 2A and Figure 2B). Arg227 defines a portion of the concave saccharide-binding surface of the active site. This residue experiences motion in catalysis. In the complex with 1, Arg227 has been lifted from the surface of the protein, such that a binding site for the peptide stem of the product 1 is now created (Figure 2C and Figure S11), to which the peptide binds. The creation of this peptide-binding pocket and its attendant binding to the substrate peptide stem that exists within the seat of the reaction pulls the entire product I (as represented by compound 1) forward by one “subsite notch” to this intermediary state. In a sense, Arg227 is behaving as a “molecular ratchet” for advancing product I in a processive manner, which would obviate the need for product I to dissociate from the enzyme and rebinding in a manner conducive of another cycle of catalysis. The enzyme would appear to use processive catalysis.

Experimental confirmation of processive catalysis in MltC. To document this mechanism, we designed an experiment in which the *E. coli* sacculus was first fragmented by MltC, followed by the removal of all peptide stems by the reaction of AmpDh3 peptidase from *Pseudomonas aeruginosa* (15). This processing of the sacculus identifies all the soluble products of the MltC reaction without the complication of the variable structures for the stem peptides.

Figure 3B shows LC/MS extracted-ion chromatograms (EICs) of reaction products of the wild-type MltC with sacculus, followed by the AmpDh3 reaction with different incubation times (0.5, 2, and 24 h). The first peak corresponds to the smallest product (8), and the subsequent peaks to oligomeric products (9–17, up to 20 saccharide length for the glycan strand). It is of interest that we also detected products with reducing-end saccharides (compounds 8'–17'), which are formed when the transient oxocarbenium species entraps a water molecule instead of the C6-hydroxyl group of the NAM. Hence, MltC actually partitions the oxocarbenium species between the C6-hydroxyl and water in a ratio of 1.9–19 (Table S1). The fidelity of entrapment of the C6 hydroxyl of the NAM moiety, the hallmark of LTase reaction, is variable, and depending on the nature of the resulting product, could be indeed quite poor. The amounts of all

products increased as a function of time, as to be expected.

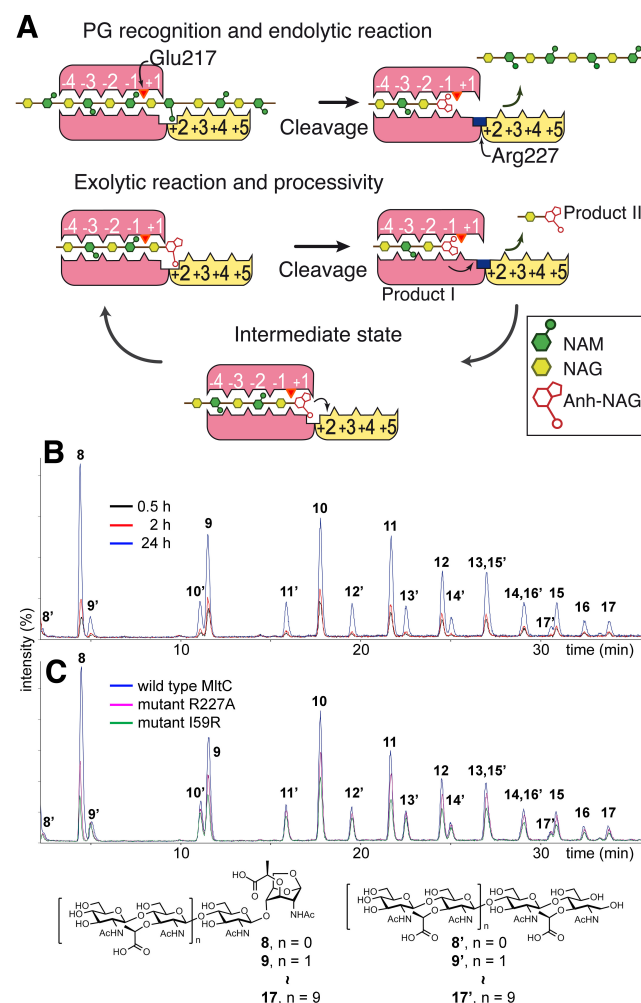


Figure 3. (A) The scheme shows the proposed mechanism for the endolytic and exolytic activities in MltC. (B) The LC/MS extracted-ion chromatograms (EICs) of the reaction products of MltC (C) and of mutants R227A and I59R with the sacculus, followed by that of AmpDh3. Note that the reducing end of the primed products was reduced by sodium borohydride to simplify the chromatogram.

In this processive turnover the larger peptidoglycan (“product I”) advances to straddle the –1 and +1 subsites to initiate catalytic formation of the disaccharide NAG-1,6-anhMur after each cycle. If the cationic character and the side-chain motion of R227 are critical to this translocation of the substrate within the active site, then altering R227 (disturbing the “molecular ratchet”) should alter the enzymatic behavior. We cloned two mutant variants of MltC, R227A and I59R (at the peptide-binding site, Figure 2C). The

mutant variants were expressed and purified to homogeneity, and were analyzed for products release from the sacculus as the substrate, as described above for the wild-type MltC (Table S2). The mutant enzymes were less active, as to be expected for an enzyme tampered within the active site. The key observation from this quantitative assay was the relative amount of the disaccharide NAG-1,6-anhMur (compound 8 without a stem peptide). Compound 8 is the product of sequential—processive—exolytic cleavage of the longer peptidoglycan. Compounds 9–17 are the other turnover products. These products could conceivably dissociate from the enzyme and rebind to the active site to engage non-processive catalysis. If enzymatic processivity were operative, one would expect that the R227 or I59R mutational effect on the formation of compound 8 should be more significant than that for all of the other products (9–17 and 9'-17'). Stated differently, the absence of processivity should reveal the same mutational effect on all products. Our data are consistent with the former and refute the latter possibility (Table S2). Hence, the exolytic activity of MltC is processive.

Table 2. Turnover of sacculus by the wild-type MltC and its mutant variants.

Enzyme	Product(s)	Percentage of total ^a	Relative mutational effect ^b
MltC	8	17%	1.0
	9()–17()^c	83%	1.0
R227A mutant	8	9%	0.3
	9()–17()^c	91%	0.6
I59R mutant	8	7%	0.2
	9()–17()^c	93%	0.5

^a Percent of the total EIC, calculated from the respective AUC values for the two sets products.

^bAmounts of products normalized to that of the wild-type MltC. ^cSum of products **9-17** and **9'-17'**.

We performed one additional experiment to document the importance of the peptide stems in the peptidoglycan to the catalytic activity of MltC. Compounds 9–17 result from the sequential degradative reactions of MltC (glycan cleavage) and of AmpDh3 (removal of the peptide stems). We isolated by liquid chromatography compounds 9–17 and incubated this glycan mixture with MltC. No change in the glycan-strand length was seen. Hence, MltC requires the presence of the peptide stems for its catalysis.

DISCUSSION

The deluge of genomic data has presented the challenge of assigning catalytic activity to each open-reading frame (16). The lytic transglycosylase family exemplifies a complementary paradox. These enzymes process the cell wall, their polymeric substrate. Yet the structural implications of the functions of the enzymes and the biological roles at the organismal level are often obscure. Nonetheless, the literature provides circumstantial evidence with respect to the function of MltC homologues—albeit encompassing observations from Gram-negative bacteria other than *E. coli*, to enable hypotheses. The distinguishing feature of MltC is its intimate fusion of a catalytic domain with an auxiliary peptidoglycan-binding N-terminal domain. As there is no structural precedent for this latter domain, its purpose must be surmised by experimentation. One possibility is preferential recognition of longer peptidoglycan strands within the sacculus, as the extended 53-Å groove within MltC accommodates it. This observation is supported by modeling into this binding site a peptidoglycan of at least nine saccharides in length, and retaining the helical conformation seen in solution for the peptidoglycan (17) (Figure 4A). This analysis can be done, *provided that the bound strand of peptidoglycan is not crosslinked* as the concave face of the N-terminal domain presents an imposing steric obstacle. The requirement for the absence of a crosslink will be reinforced in the living bacterium, as the turgor pressure of the cell renders taut the crosslinked stem peptide. Yet, we identify products with crosslinked peptide stems from the reaction of MltC with the sacculus (6). This observation is consistent only with the possibility that the neighboring strand of peptidoglycan must be processed by other autolysins prior to its recognition by MltC. In this manner, the tautness within that strand due to the turgor pressure is abolished, and the peptide stem can bind to the surface of the active site of MltC. Hence, this is a role for catalysis by MltC. *It is a lytic transglycosylase that can only process a strand of peptidoglycan (both in endolytic and exolytic transformations), whose neighboring strand is already turned over by another enzyme.*

Finally, we note that the N-terminal domain of MltC has been designated as DUF3393—Domain of Unknown Function 3393 (Pfam family 11873). Genomic searching revealed that the genomes of 791 bacteria encode a lytic transglycosylase having the N-terminal DUF3393 domain (Figure S12). This motif is essentially the entire MltC

structure, as studied in the present report. It is likely that this enzyme is more broadly present in bacteria, but the state of the art for analysis of sequences might not be sufficiently sophisticated to identify other homologues, as the sequences diverge. Regardless, the broad presence of MltC (or MltC-like) open-reading frames in various bacteria only argues for the centrality of its biological function to bacteria.

Within the context of our study of reactions and the structure of MltC of *E. coli*, we have disclosed that this enzyme can process a long strand of peptidoglycan once the neighboring crosslinked peptidoglycan is already turned over by other autolysins. In what biological context would this activity be necessary? Intriguing observations have emerged from efforts with MltC homologues. The recent study of Römmling et al. (18) directly correlates the MltC activity of *Salmonella enterica* (serovar typhimurium) with the competence to initiate biofilm formation, which (in this organism and numerous other bacteria) correlates to the loss of unencumbered rotation of the flagellum (18-21). The unequivocal function of MltC is processing of the cell wall, as disclosed herein. The linkage of this reaction to a functional assembly of flagellum is of note within the context of the structure of MltC. We noted that the stretch of amino acids 19-29 in the MltC structure is disordered. The residue Cys17, just to the N-terminal side of this stretch, is the point of linkage to the membrane via a thioether tether. It is tempting to speculate that the disorder within the residues 19-29 would impart the ability for a rotational motion to MltC to sweep out a large annulus of cleared peptidoglycan per each molecule of enzyme (Figure 4B), which would enable insertion of a large assembly such as that of the flagellum.

MATERIALS AND METHODS

Cloning of the *mltC* gene from *E. coli* K12. Genomic DNA from *E. coli* K12 was used as the template for cloning of the full-length *mltC*. The PCR was accomplished using the following primers, mltC-fw-NdeI (5'-AGATATACATATGACCAAAAAGGCGATAC-3', with the *NdeI* cut site underlined) and mltC-rv-XhoI (5'-CATCTCGAGTTATCGGCGGCGGTAGGATTTTTCGGC GGTATTC-3', with the *XhoI* cut site underlined). The conditions used for the PCR were as follows: 30 cycles of denaturation at 94 °C for 40 s, followed by annealing of primers for 40 s at 60 °C, and extension for 3 min at 72 °C using Pfu DNA polymerase. The reaction volume was 50 µL and

contained 0.2 mM triphosphoryldeoxynucleotides (dNTPs), 0.5 µM of each primer, 50 ng of template DNA, and 1 µL of Pfu DNA polymerase. After purification of the PCR product, the fragments were digested with *NdeI* and *XhoI* and the resulting piece was ligated into a *NdeI* and *XhoI* sites of the T7 expression vector pET-28a-c(+). The recombinant plasmid pET28mltC was constructed and confirmed by sequencing.

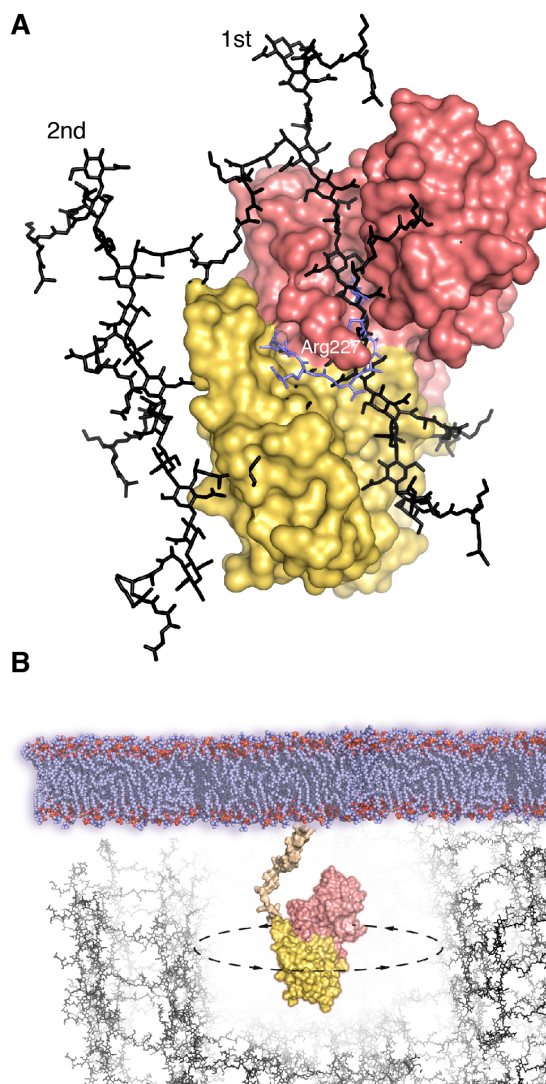


Figure 4. (A) The NMR-based structure of a crosslinked peptidoglycan (in black) is superimposed on the coordinates for the tetrasaccharide from the X-ray structures of the MltC·5 complex (as in Figure 2A). Compound 1 as observed in the MltC·1 complex is represented in blue sticks. (B) Rotational motion of a single membrane-bound MltC with its disordered linker (residues 19-29, depicted in light brown) could create a large annulus of cleared peptidoglycan.

Construction of the *mltC* mutants. The method from Green & Sambrook²² to create a single specific mutation was used. The method uses four primers and three PCRs to create a site-specific mutation by overlap extension. One pair of primers is used to amplify DNA that contains the mutation site together with upstream sequences. The second pair of primers is used in a separate PCR to amplify DNA that contains the mutation site together with downstream sequences. The mutation is located in the region of overlap and therefore in both amplified fragments. The overlapping fragments are mixed, denatured, and annealed to generate heteroduplexes that can be extended in a third PCR to amplify the full length gene using two primers that bind to the extremes of the fragments. For all the mutants, the pET28mltC plasmid was used as the template DNA and we used the primers mltC-fw-NdeI and mltC-rv-XhoI. In the case of the *mltCI59R* mutant, we used the following primers 5'-CTTCAAAGAGGTGGTGC~~CG~~CCTGGTCCTAAGGAC and 5'-GTCCTTAGGACCAGCGCGCACCACCTCTTTGAAG. For *mltCR227A*, primers 5'-AACCCGTATGCGGTCAGCGCTTCCGATGCGCTGGGA TTA and 5'-TAATCCCAGCGCATCGGAAGCGCTGACCGCATACGG GTT were used. The PCR products were purified and digested as described above, and the recombinant plasmids pET28mltCI59R and pET28mltCR227A were confirmed by sequencing.

Protein expressions and purifications. Colonies containing the construct were selected on LB agar supplemented with 30 mg/mL of Kanamycin. Selected cells were incubated overnight in 5 mL of LB medium supplemented with 50 µg/mL of Kanamycin. The cells were diluted into 1 L of fresh Kanamycin-supplemented LB medium and growth was continued with agitation (120 rpm) at 37 °C until the culture reached OD₆₀₀ of 0.8. Isopropyl-β-D-thiogalactoside (IPTG) was added at this stage to a concentration of 0.4 mM and the cultures were incubated at 37 °C for an additional 4 h. Cells were harvested by centrifugation, resuspended in 10 mL of 50 mM Tris buffer, pH 8.0, supplemented with 0.3 M NaCl and 20 mM imidazole. Bacteria were disrupted by sonification on ice for 20 cycles of 30 s each with 30 s rest in between cycles. Bacterial debris was removed by centrifugation at 18 000 g for 45 min. The supernatant was loaded onto a 5 mL HiTrap Chelating column (GE). The column was washed with 50 mM Tris buffer, pH 8.0, supplemented with 0.3 M NaCl and 20 mM imidazole. Elution was performed using 50 mM Tris buffer, pH 8.0, supplemented with 0.3 M NaCl

and 1 M imidazole. The protein was homogeneous by SDS-PAGE. Average molecular masses (*M_r*s) of purified MltCs (wild type and two mutants) were determined by LC/MS (Table S2).

The protein with His-Tag did not crystallize. Therefore, we removed the His-Tag for the purpose of crystallization by the following procedure. After the Ni-column purification, MltC (32 mg) was dialyzed into 20 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 8.0. We added 320 units of recombinant thrombin to the mixture and allowed the solution to sit at 4 °C during 20 h without shaking, at which time SDS PAGE analysis indicated that the reaction was complete. The sample was run through another Ni-column to retain any traces of unprocessed protein. The processed MltC run through as a single fraction.

Synthesis of Compounds. Compounds **1-6** were prepared according to the literature methods developed by our laboratory.^{13,14}

Reaction of MltC/AmpDh3 with the bacterial sacculus and reaction products quantification.

MltC (1.7 µM final concentration) was incubated with 100 µL of the sacculus preparation⁶ in 20 mM HEPES, pH 7.0 with 100 mM NaCl and 0.1% Triton X-100 at 37 °C. At various time points (0.5, 2 and 24 h), the reaction was stopped by boiling for 3 min. The reaction mixture was concentrated to dryness, reconstituted in 20 mM phosphate buffer, pH 8.0, and incubated in the presence of AmpDh3 (3 µM final concentration)²³ at 37 °C for 5 h. The mixture was boiled for 3 min and was concentrated to dryness. The residue was reduced with sodium borohydride (2 mg) for 40 min and the reduction reaction was quenched by addition of formic acid. After centrifugation of the resultant suspension (10 min at 14 000 g), the supernatant was separated and was used for analysis by LC/MS, according to conditions described previously.⁶ Briefly, the LC/MS instrument consisted of a Dionex Ultimate 3000 Rapid Separation UPLC system and coupled with a Bruker MicrOTOF-Q II quadrupole time-of-flight hybrid mass spectrometer with electrospray ionization source. Liquid chromatographic separations were achieved by a Dionex Acclaim™ PolarAdvantage II C18 column (3 µm, 2.1 mm i.d. × 150 mm) using water/acetonitrile (with 0.1% formic acid) as mobile phase. Peak areas from extracted-ion chromatograms of the corresponding *m/z* values were integrated and normalized to the internal standard (compound **5**).²³ Total peak areas included the contributions from peak areas of charge states +1, +2, +3, +4, +5 and +6, when present.

Liquid Chromatography/Mass Spectrometry for determination of molecular mass of purified proteins. The LC/MS instrument consisted of a Dionex Ultimate 3000 Rapid Separation UPLC system equipped with a Dionex Ultimate 3000 autosampler and a Dionex Ultimate 3000 photodiode array detector coupled with a Bruker MicrOTOF-Q II quadrupole time-of-flight hybrid mass spectrometer using Hystar 3.2 software. The Bruker electrospray ionization source was operated in the positive ion mode with the following parameters: end plate offset voltage = -500 V, capillary voltage = 2000 V, and nitrogen as both a nebulizer (3 bar) and dry gas (6.0 L/min flow rate at 200 °C temperature). Mass spectra were accumulated over the mass range 300 – 3000 Da at an acquisition rate of 5,000 per second. Separations were performed on a Phenomenex Aeris widepore C4 column (3.6 μ m, 2.1 mm i.d. \times 150 mm). The mobile phase (A = 0.1% formic acid in water; B = 0.1% formic acid in acetonitrile) gradient consisted of elution at 0.3 mL/min with 70% A/30% B for 5 min, followed by a 10-min linear gradient to 10% A/90% B, a 0.1-min linear gradient to 70% A/30% B, and then 70% A/30% B for 5 min. Multiply charged ions were deconvoluted using the maximum entropy algorithm.

Crystallization. Native protein MltC was used at 14 mg/mL, in a buffer of 50 mM Tris pH 8, 250 mM Sodium chloride, and 0.1% Triton X-100. Crystals grew in 18% PEG 3350 and 0.2 M triammonium citrate pH 7.5, using the hanging drop vapour-diffusion method at 291 K. The mixture consisted of equal volumes of protein with precipitant solution (1 μ L) and equilibrated against 500 μ L of the reservoir solution. The crystals were soaked into cryoprotectant solution (20% PEG 400), before flash cooling at 100 K. The complex of MltC with anhydro-disaccharide-pentapeptide (MltC·1) was obtained growing crystals of the protein mutant E217Q at 14 mg/mL, (in buffer 20 mM Tris pH 7.5, 150 mM NaCl and 0.1% Brij) in the same crystallization condition (18% PEG 3350 and 0.2 M triammonium citrate pH 7.5) and using streak seeding techniques with the native crystals. In order to obtain the complex, these crystals were soaked in a 20 mM solution of compound 1 mixed with the cryoprotectant (20% PEG 400).

The complexes of MltC with tetrasaccharides, MltC·5 and MltC·6 were obtained by soaking crystals of MltC E217Q into a 5 mM solution of compound 5 and 6 overnight. Crystals were cryoprotected using 20% PEG 400.

Data collection and processing. For the native MltC crystals, 1996 images were collected at the ESRF synchrotron (Grenoble, France), with an oscillation of 0.1° and 1.72 Å resolution on beamline ID29, using a Pilatus 6M detector and fixed wavelength of 1.74709 Å. MltC crystallized in the space group P2₁, with unit cell parameters of $a = 49.87$ Å, $b = 114.65$ Å, $c = 61.40$ Å, $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 93.46^\circ$. Two monomers were found in the asymmetric unit.

For the complex of MltC·1, a complete X-ray diffraction data set of 180 images was collected at the ESRF in beamline ID23-2 using a CCD detector. The oscillation range was of 1.0° and the wavelength was fixed at 0.87260 Å. MltC·1 crystallized in the same space group as the apo form (P2₁), and unit cell parameters were of $a = 50.16$ Å, $b = 115.0$ Å, $c = 61.28$ Å, $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 93.21^\circ$. All collected images were indexed, integrated and scaled using XDS²⁴, IMOSFLM and SCALA from CCP4²⁵ program suite. Two monomers were found in the asymmetric unit.

For complexes MltC·5 and MltC·6, a complete X-ray diffraction data set of 1800 images was collected for both complexes at ALBA synchrotron (Barcelona, Spain) in BL13-XALOC beamline, with an oscillation range of 0.2° and a fixed wavelength of 0.9794 Å. A Pilatus 6M detector was used for collection. MltC·5 crystallized in the space group P2₁, with unit cell parameters of $a = 49.51$ Å, $b = 114.33$ Å, $c = 61.71$ Å, $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 93.28^\circ$. MltC·6 also crystallized in space group P2₁, with unit cell parameters of $a = 49.2$ Å, $b = 112.81$ Å, $c = 61.57$ Å, $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 93.52^\circ$. All collected images were indexed, integrated and scaled using XDS²⁴, IMOSFLM and SCALA from CCP4²⁵ program suite, and in both cases two monomers were found in the asymmetric unit.

Structure solution and refinement. MltC apo structure was solved using ARCIMBOLDO²⁶ at 2.7 Å resolution (although later on data to at 2.33 Å resolution became available), using fragments of the structure of MltE⁹ (2Y8P) that shares a homology of 40% with the C-terminal part of the MltC structure. The best partial solution, characterized by a TFZ score of 7.2 in PHASER²⁷, was extended in multiple ways adding side chains with SCWRL4²⁸ and refined with BUSTER²⁹. SHELXE³⁰ was used to apply density modification and autotracing to the refined models, rendering a main-chain trace spanning 352 residues, approximately 50% of the protein contents of the asymmetric unit, and characterized by a CC³¹ of 25.77%. The model was manually completed using COOT³² and was refined with PHENIX³³. The R_{work} converged to 0.19 and the R_{free} to 0.26 in the

final model. The structure of the complex MltC·1 was solved by Molecular Replacement (MR) at 2.45 Å resolution, using the native structure of MltC as initial model. MR was done using MOLREP³⁴ and refined with PHENIX³³. Final values of R_{work} and R_{free} are 0.19 and 0.26 respectively.

The rmsd value for the C α of the complex compared to the native structure is 0.477 Å for chain A and 0.412 Å for chain B. The ligand 1 was refined with full occupancy and for both, the native and the complex structure.

The complex of MltC·5 was solved by MR at 2.15 Å resolution, using the native structure of MltC as initial model. MR was done using MOLREP³⁴ and refined with PHENIX³³. Final values of R_{work} and R_{free} are 0.19 and 0.25 respectively.

The rmsd value for the C α of the complex MltC·5 compared to the native structure is 0.429 Å for chain A and 0.228 Å for chain B. The ligand 5 was refined with full occupancy.

The third complex of MltC·6 was solved using MR at 2.9 Å resolution, using the native structure of MltC as initial model. MR was done using MOLREP³⁴ and refined with PHENIX³³. Final values of R_{work} and R_{free} are 0.16 and 0.25 respectively.

The rmsd value for the C α of the complex MltC·6 compared to the native structure is 0.530 Å for chain A and 0.646 Å for chain B. The ligand 6 was refined with full occupancy.

Data refinement results are summarized in Table 1.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information available. Supplemental Tables and Figures. The crystallographic coordinates are deposited in the Protein Data Bank (PDB codes 4C5F, 4CHX, 4CFP and 4CFO for MltC, MltC·1 complex, MltC·5 complex and MltC·6 complex, respectively).

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

E mail: mobashery@nd.edu and xjuan@iqfr.csic.es

ACKNOWLEDGMENT

We thank the staff from ESRF and ALBA synchrotron beamlines for help in data collection. This work was supported by a grant from the US National Institutes of Health (GM61629) and by grants BFU2011-25326 (the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness) and S2010/BMD-2457 (the Government of Community of Madrid). KM is grateful to a Juan de la Cierva grant. IU is grateful to the Spanish MINECO and Generalitat de Catalunya for financial support (IDC-20101173 and 2009SGR-1036). The Mass Spectrometry & Proteomics Facility of the University of Notre

Dame is supported by grant CHE0741793 from the NSF.

REFERENCES

- (1) Fisher, J. F.; Mobashery, S. *J. Med. Chem.* **2010**, *53*, 4813-4829.
- (2) (a) Park, J. T.; Uehara, T. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2008**, *72*, 211-227. (b) Suvorov, M.; Fisher, J. F.; Mobashery, S., Bacterial Cell Wall: Morphology and Biochemistry. In *Practical Handbook of Microbiology*, 2nd ed.; Goldman, E.; Green, L. H., Eds.; CRC Press: **2009**.
- (3) (a) Scheurwater, E.; Reid, C. W.; Clarke, A. J. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2008**, *40*, 586-591. (b) van Heijenoort, J. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2011**, *75*, 636-663.
- (4) Scheurwater, E. M.; Clarke, A. J. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 8363-8373.
- (5) Heidrich, C.; Ursinus, A.; Berger, J.; Schwarz, H.; Hölte, J. V. *J. Bacteriol.* **2002**, *184*, 6093-6099.
- (6) Lee, M.; Heseck, D.; Llarrull, L. I.; Lastochkin, E.; Pi, H.; Boggess, B.; Mobashery, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 3311-3314.
- (7) van Straaten, K. E.; Dijkstra, B. W.; Vollmer, W.; Thunnissen, A. M. *J. Mol. Biol.* **2005**, *352*, 1068-1080.
- (8) van Asselt, E. J.; Dijkstra, A. J.; Kalk, K. H.; Takacs, B.; Keck, W.; Dijkstra, B. W. *Structure* **1999**, *7*, 1167-1180.
- (9) (a) Artola-Recolons, C.; Carrasco-López, C.; Llarrull, L. I.; Kumarasiri, M.; Lastochkin, E.; Martínez de Ilarduya, I.; Meindl, K.; Usón, I.; Mobashery, S.; Hermoso, J. A. *Biochemistry* **2011**, *50*, 2384-2386. (b) Fibriansah, G.; Gliubich, F. I.; Thunnissen, A.-M. W. H. *Biochemistry* **2012**, *51*, 9164-9177.
- (10) van Asselt, E. J.; Thunnissen, A. M.; Dijkstra, B. W. *J. Mol. Biol.* **1999**, *291*, 877-898.
- (11) Romeis, T.; Hölte, J. V. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 21603-21607.
- (12) Holm, L.; Rosenström, P. *Nucleic Acids Res.* **2010**, *38*, W545-W549.
- (13) (a) Heseck, D.; Lee, M.; Zhang, W.; Noll, B. C.; Mobashery, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 5187-5193. (b) Lee, M.; Heseck, D.; Shah, I. M.; Oliver, A. G.; Dworkin, J.; Mobashery, S. *ChemBioChem* **2010**, *11*, 2525-2529. (c) Lee, M. J.; Zhang, W. L.; Heseck, D.; Noll, B. C.; Boggess, B.; Mobashery, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8742-8743.
- (14) Martínez-Caballero, S.; Heseck, D.; Lee, M.; Artola-Recolons, C.; Carrasco-López, C.; Heseck, D.; Spink, E.; Lastochkin, E.; Zhang, W.; Hellman, L. M.; Boggess, B.; Mobashery, S.; Hermoso, J. A. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 10318-10321.
- (15) Lee, M.; Artola-Recolons, C.; Carrasco-López, C.; Martínez-Caballero, S.; Heseck, D.; Spink, E.; Lastochkin, E.; Zhang, W.; Hellman, L. M.; Boggess, B.; Hermoso, J. A.; Mobashery, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12604-12607.
- (16) Gerlt, J. A.; Allen, K. N.; Almo, S. C.; Armstrong, R. N.; Babbitt, P. C.; Cronan, J. E.; Dunaway-Mariano, D.;

- Imker, H. J.; Jacobson, M. P.; Minor, W.; Poulter, C. D.; Raushel, F. M.; Sali, A.; Shoichet, B. K.; Sweedler, J. V. *Biochemistry* **2011**, *50*, 9950–9962.
- (17) Meroueh, S. O.; Bencze, K. Z.; Heseck, D.; Lee, M.; Fisher, J. F.; Stemmler, T. L.; Mobashery, S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103*, 4404–4409.
- (18) Monteiro, C.; Fang, X.; Ahmad, I.; Gomelsky, M.; Römling, U. *J. Bacteriol.* **2011**, *193*, 6443–6451.
- (19) Belas, R.; Zhulin, I. B.; Yang, Z. *J. Bacteriol.* **2008**, *190*, 1849–1856.
- (20) Duan, Q.; Zhou, M.; Zhu, L.; Zhu, G. *J. Basic Microbiol.* **2013**, *53*, 1–8.
- (21) Guttenplan, S. B.; Kearns, D. B. *FEMS Microbiol. Rev.* **2013**, *37*, 849–871.
- (22) Green, M. R.; Sambrook, J., *Molecular cloning: A laboratory manual*. 4th ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press: 2012.
- (23) Zhang, W.; Lee, M.; Heseck, D.; Lastochkin, E.; Boggess, B.; Mobashery, S. *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 4950–4953.
- (24) Kabsch, W. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **2010**, *D66*, 125–132.
- (25) Collaborative Computational Project, N. *Acta Crystallogr.* **1994**, *D50*, 760–763.
- (26) (a) Rodríguez, D. D.; Grosse, C.; Himmel, S.; González, C.; Martínez de Ilarduya, I.; Becker, S.; Sheldrick, G. M.; Usón, I. *Nat. Methods*, **2009**, *6*, 651–653.
- (b) Rodríguez, D.; Sammito, M.; Meindl, K.; Martínez de Ilarduya, I.; Potratz, M.; Sheldrick, G. M.; Usón, I. *Acta Crystallogr.* **2012**, *D68*, 336–343.
- (27) McCoy, A. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; Adams, P. D.; Winn, M. D.; Storoni, L. C.; Read, R. J. *J. Appl. Crystallogr.* **2007**, *40*, 658–674.
- (28) Krivov, G. G.; Shapovalov, M. V.; Dunbrack, R. L. *Proteins* **2009**, *77*, 778–795.
- (29) Bricogne, G.; Blanc, E.; Brandl, M.; Flensburg, C.; Keller, P.; Paciorek, W.; Roversi, P.; Sharff, A.; Smart, O.S.; Vonrhein, C.; Womack, T.O.; BUSTER version X.Y.Z. **2011**, Cambridge, United Kingdom: Global Phasing Ltd.
- (30) Sheldrick, G. M. *Acta Crystallogr.* **2010**, *D66*, 479–485.
- (31) Fujinaga, M.; Read, R.J. *J. Appl. Crystallogr.* **1987**, *20*, 517.
- (32) Emsley, P.; Cowtan, K. *Acta Crystallogr.* **2004**, *D60*, 2126–2132.
- (33) Adams, P. D.; Afonine, P. V.; Bunkóczi, G.; Chen, V. B.; Davis, I. W.; Echols, N.; Headd, J. J.; Hung, L.-W.; Kapral, G. J.; Grosse-Kunstleve, R. W.; McCoy, A. J.; Moriarty, N. W.; Oeffner, R.; Read, R. J.; Richardson, D. C.; Richardson, J. S.; Terwilliger, T. C.; Zwart, P. H. *Acta Crystallogr.* **2010**, *D66*, 213–221.
- (34) Vagin, A.; Teplyakov, A. *J. Appl. Crystallogr.* **1997**, *30*, 1022–1025.

TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN

Table 1. Data collection and refinement statistics

	MltC	MltC·1 complex [#]	MltC·5 complex [#]	MltC·6 complex [#]
Diffraction data statistics				
Wavelength (Å)	1.74709	0.87260	0.97948	0.97948
Space group	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁	P2 ₁
<i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å)	49.87, 114.65, 61.40	50.16, 115, 61.28	49.51, 114.33, 61.77	49.21, 112.81, 61.57
α , β , γ	90, 93.46, 90	90, 93.21, 90	90, 93.28, 90	90, 93.52, 90
Resolution range (Å)	45.66-2.34 (2.46-2.33)	50.08-2.45 (2.58-2.45)	49.43-2.15 (2.23-2.15)	43.03-2.9 (2.9-3.07)
Unique reflections	28559 (2263)	25528 (2539)	37159 (3686)	18454 (2311)
Completeness (%)	97.22 (84.21)	100.0 (100.0)	99.68 (99.84)	99.8 (99.8)
Redundancy	3.6 (3.2)	3.7 (3.7)	5.4 (5.0)	4.2 (4.0)
R _{merge}	0.12 (0.62)	0.18 (0.94)	0.11 (0.54)	0.16 (0.40)
Average I/s(I)	8.64 (1.8)	7.2 (1.5)	6.6 (1.9)	3.6 (2.2)
Refinement statistics				
Resolution range (Å)	45.66-2.34	45.92-2.45	49.43-2.15	14.93-2.9
R _{work} /R _{free}	0.19/0.26	0.19/0.26	0.19/0.26	0.16/0.25
No. Atoms				
Protein	5214	5154	5154	5154
Water	104	102	203	48
Ligand	-	69	168	136
B-factor (Å ²)				
Protein	43.30	43.60	42.50	36.70
Water	37.40	32.50	38.70	27.00
Ligand	-	93.90	38.70	27.00
R.m.s. deviations				
Bond length (Å)	0.011	0.015	0.013	0.030
Bond angles (°)	1.26	1.38	1.21	2.05
Ramachandran favored/outliers (%)	98.0/0.3	98.0/0.0	96.0/0.46	94/0.3
Residues in the AU	660	654	654	654
PDB code	4C5F	4CHX	4CFP	4CFO

8.3. INFORMACIÓN ADICIONAL

Supporting Information

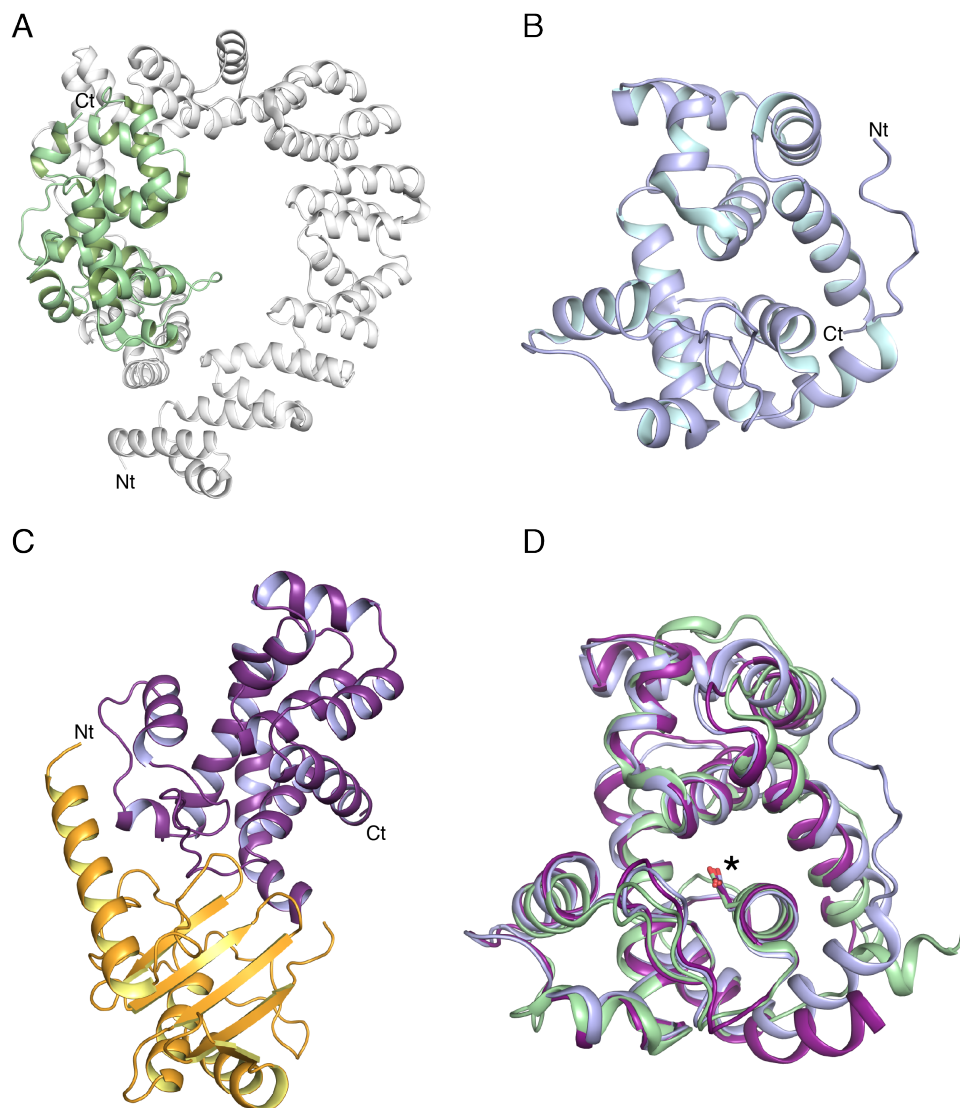


Figure S1. Comparison of the catalytic domains from different lytic transglycosylases: Slt70 (A), MltE (B) and MltC (C). As assessed by DALI server, the closest structural homologues of MltC are Slt70, a lytic transglycosylase from *E. coli* (Z score 17.6, rmsd of 5.5 Å for 620 Ca atoms) and the MltE, also a lytic transglycosylase from *E. coli* (Z score 26.4, rmsd of 1.5 Å for 185 Ca atoms). (A) In the three-dimensional structure of the Slt70, the catalytic domain is highlighted in green. (B) Three-dimensional structure of MltE. (C) Crystal structure of the MltC lytic transglycosylase, in which the catalytic domain is colored in purple and the N-terminal domain in yellow. (D) Structural superimposition of the catalytic domain of all related transglycosylases, the catalytic residue, the proton donor, is highlighted with an asterisk.

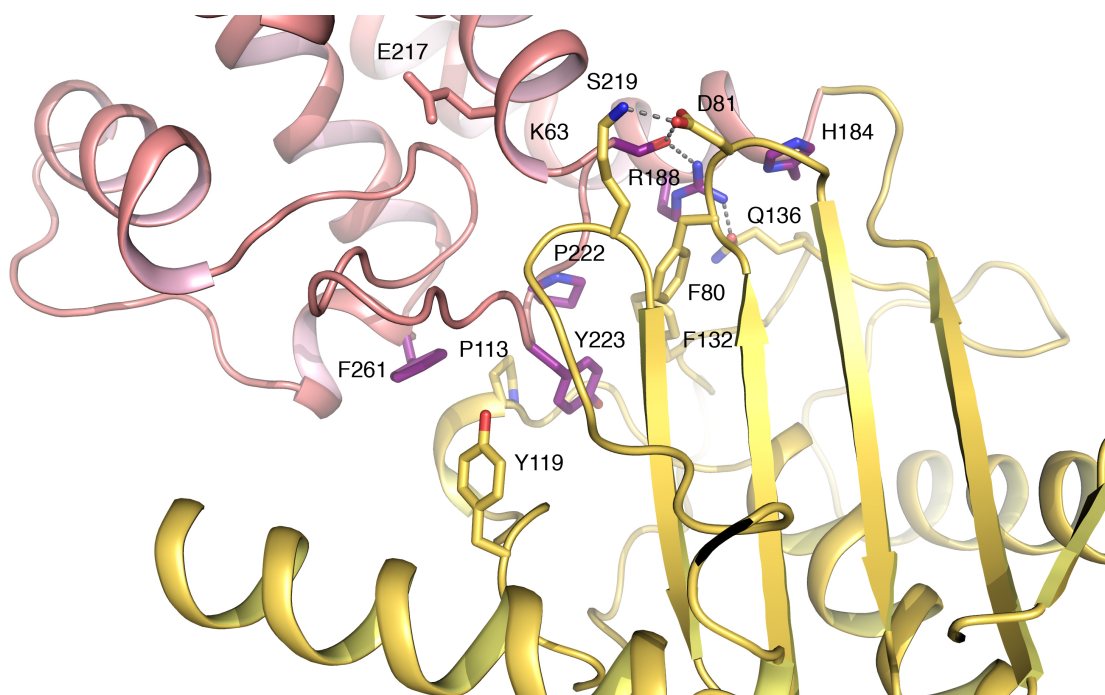


Figure S2. Inter-domain interactions in MltC. Relevant residues involved in the interface between the N-terminal and catalytic domains are represented as capped sticks and labeled. Hydrogen bonds and salt-link interactions are represented as dotted lines. The catalytic Glu217 is represented in pink-capped sticks.

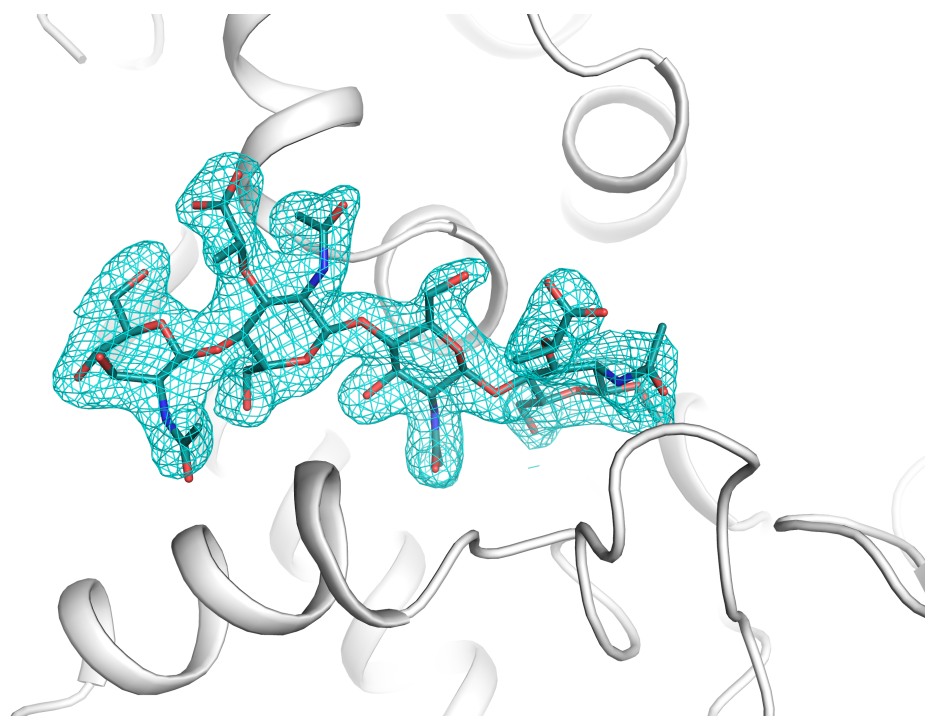


Figure S3. Electron density for the tetrasaccharide observed in the MltC-5 complex. Electron density corresponds to the (2Fo-Fc) map contoured at 1σ .

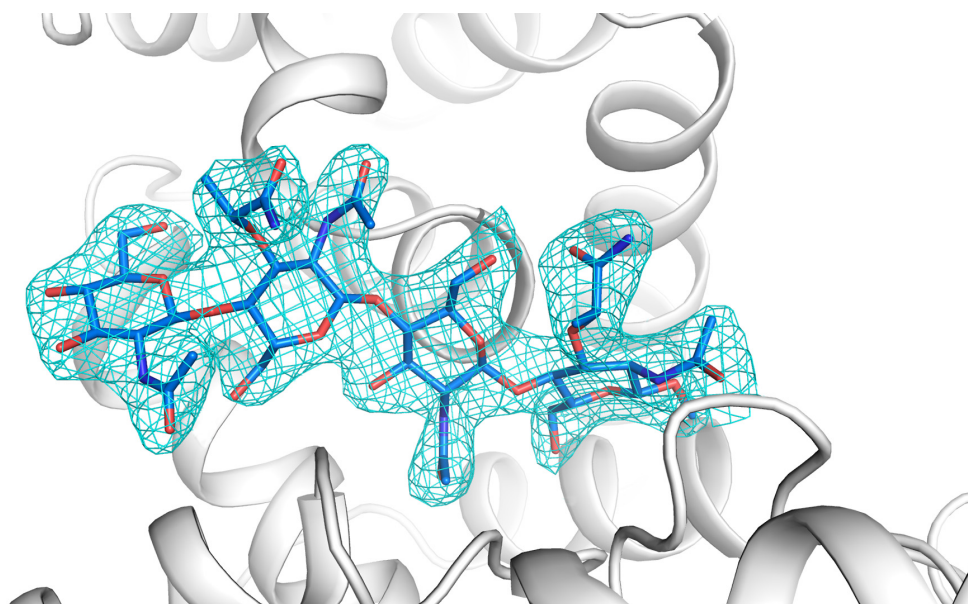


Figure S4. Electron density for the tetrasaccharide observed in the MltC-6 complex. Electron density corresponds to the (2Fo-Fc) map contoured at 1σ .

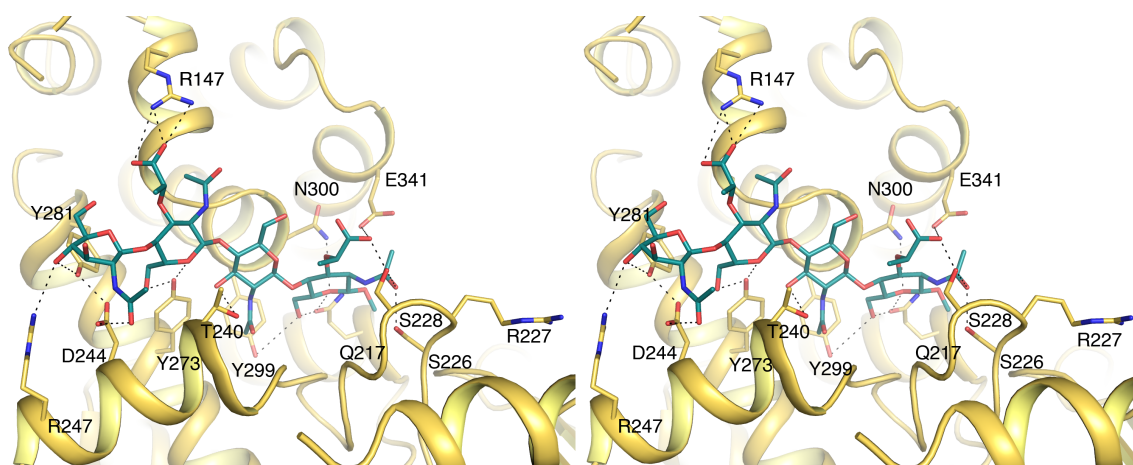


Figure S5 Stereo view showing the interactions between MltC and the tetrasaccharide **5**. Compound **5** is depicted in green-capped sticks (for carbon atoms) and the residues forming the active site are drawn in capped sticks and colored in yellow (for carbon atoms). Salt-bridges and hydrogen bonds are shown as dashed lines.

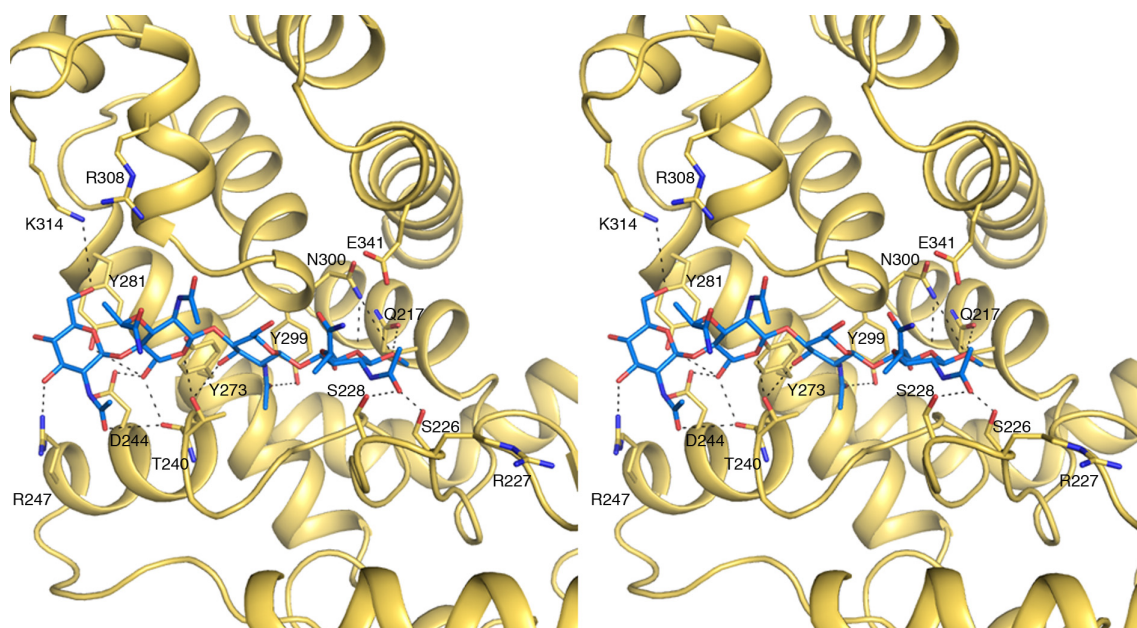


Figure S6. Stereo view showing the interactions between MltC and the tetrasaccharide **6**. Compound **6** is depicted in blue-capped sticks (for carbon atoms) and the residues forming the active site are drawn in capped sticks and colored in yellow (for carbon atoms). Salt-bridges and hydrogen bonds are shown as dashed lines.

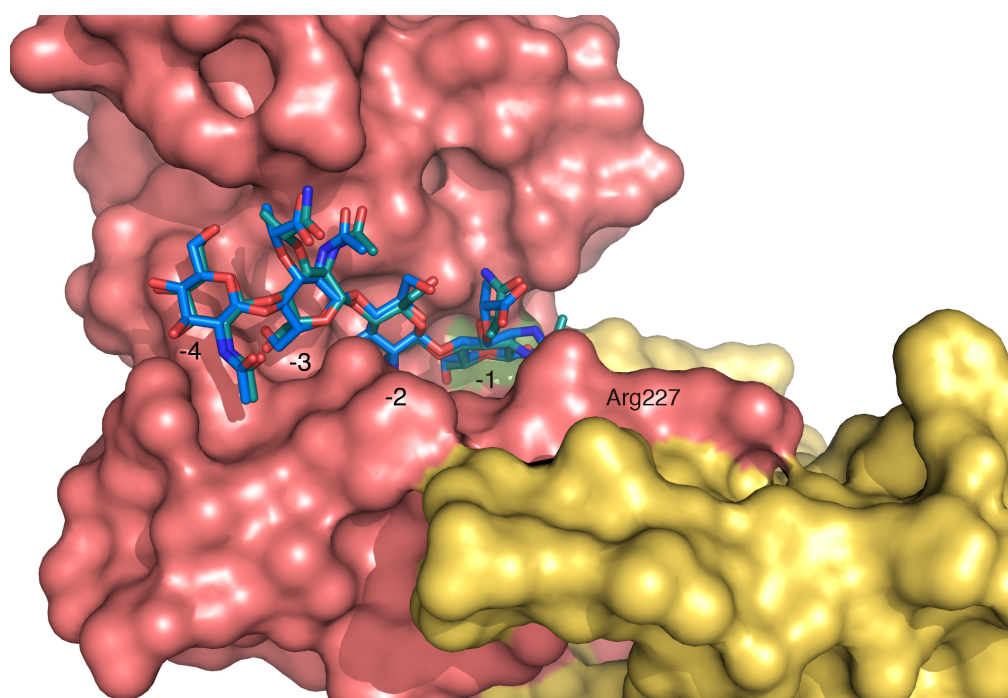


Figure S7. Molecular surface representation of MltC in complex with tetrasaccharide **5**. The N-terminal domain is colored in yellow and the catalytic domain in pink. The position of the catalytic Glu217 residue (Gln217 in the complex) is colored in green. The tetrasaccharide **5** sequestered at the peptidoglycan-binding groove is represented in blue-capped sticks for carbon atoms. The tetrasaccharide **6** as observed in the MltC.**6** complex is superimposed and represented as green-capped sticks for the carbon atoms. The surface corresponding to Arg227 is labeled.

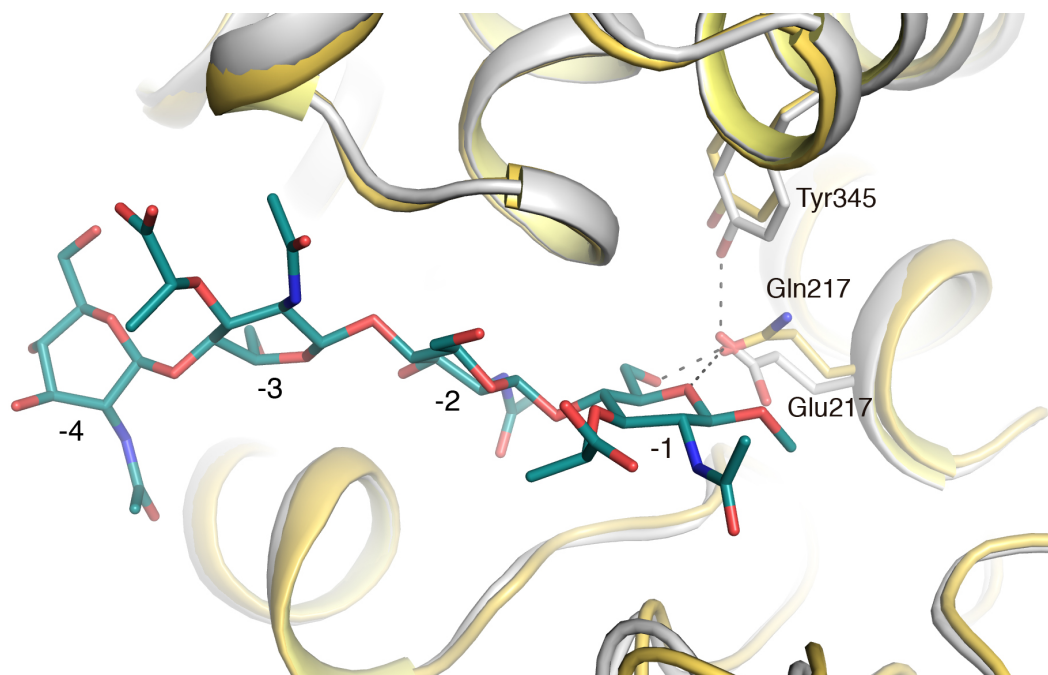


Figure S8. Superimposition of the crystal structure of wild-type MltC (white cartoon) and the inactive (E217Q mutant) in complex with **5** (yellow). Compound **5** is depicted in green-capped sticks (for carbon atoms) and the Tyr345 and Glu/Gln217 are depicted as capped sticks and colored as the corresponding ribbons. Hydrogen bonds are shown as dashed lines. In the wild-type enzyme, catalytic Glu217 orients one of the oxygen of the carboxylate to the substrate and the other makes a hydrogen bond with Tyr345. In the inactive mutant, Gln217 orients the terminal oxygen atom to the saccharide backbone.

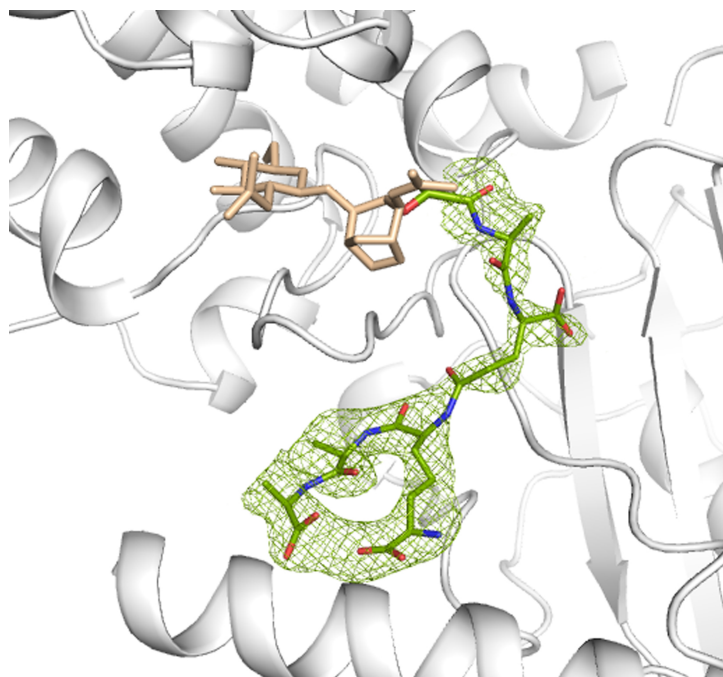


Figure S9. Electron density for the reaction product (Ala- γ -D-Glu-*m*-DAP-D-Ala-D-Ala) observed in the MltC-1 complex. The peptide stem is depicted as green-capped sticks for carbon atoms. Electron density corresponds to the (2Fo-Fc) map contoured at 1s. The electron density for the disaccharide (depicted as light-brown capped sticks) was very poor and model was not included in the refinement.

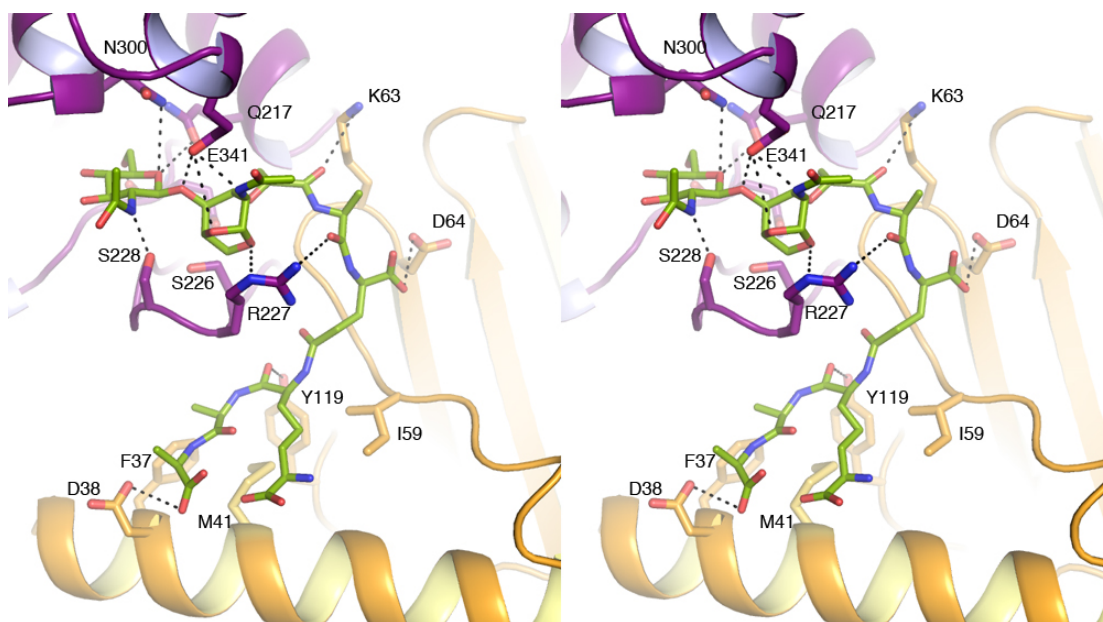


Figure S10. Stereo view showing the interactions between MltC and the reaction product **1** as seen in the MltC·**1** complex. The conformation for the disaccharide was obtained by energy minimization. Compound **1** is depicted in green sticks (for carbon atoms) and the residues involved in ligand recognition are drawn in capped sticks (yellow for the N-terminal domain and magenta for the catalytic domain). Salt-bridges and hydrogen bonds are shown as dashed lines.

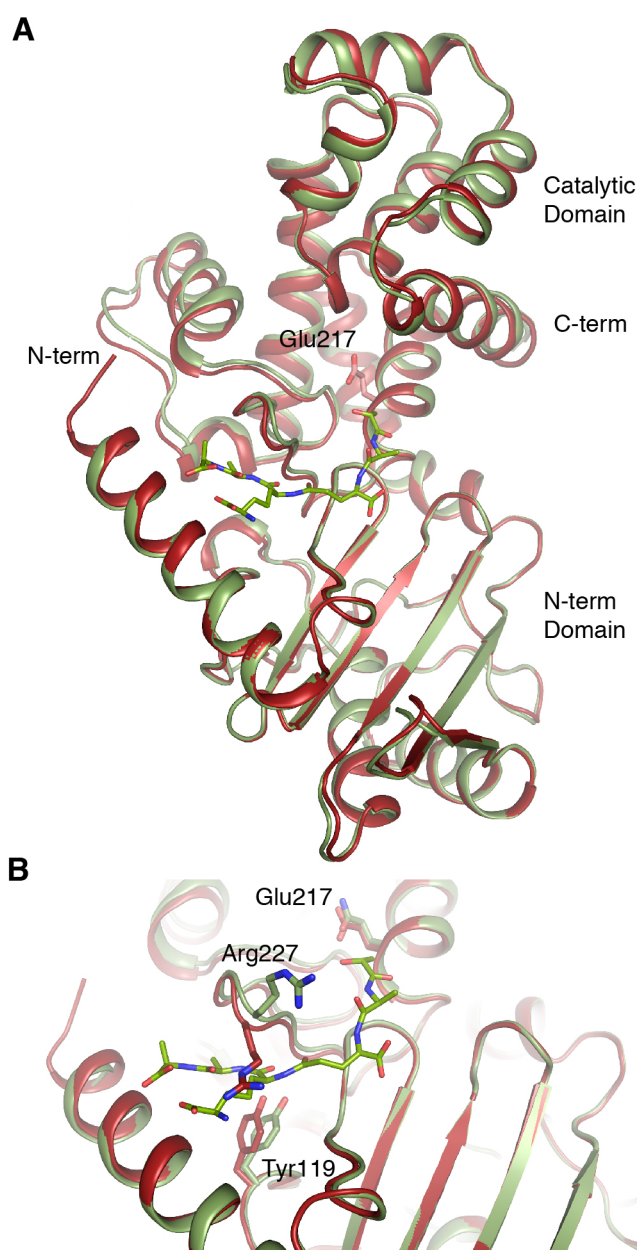
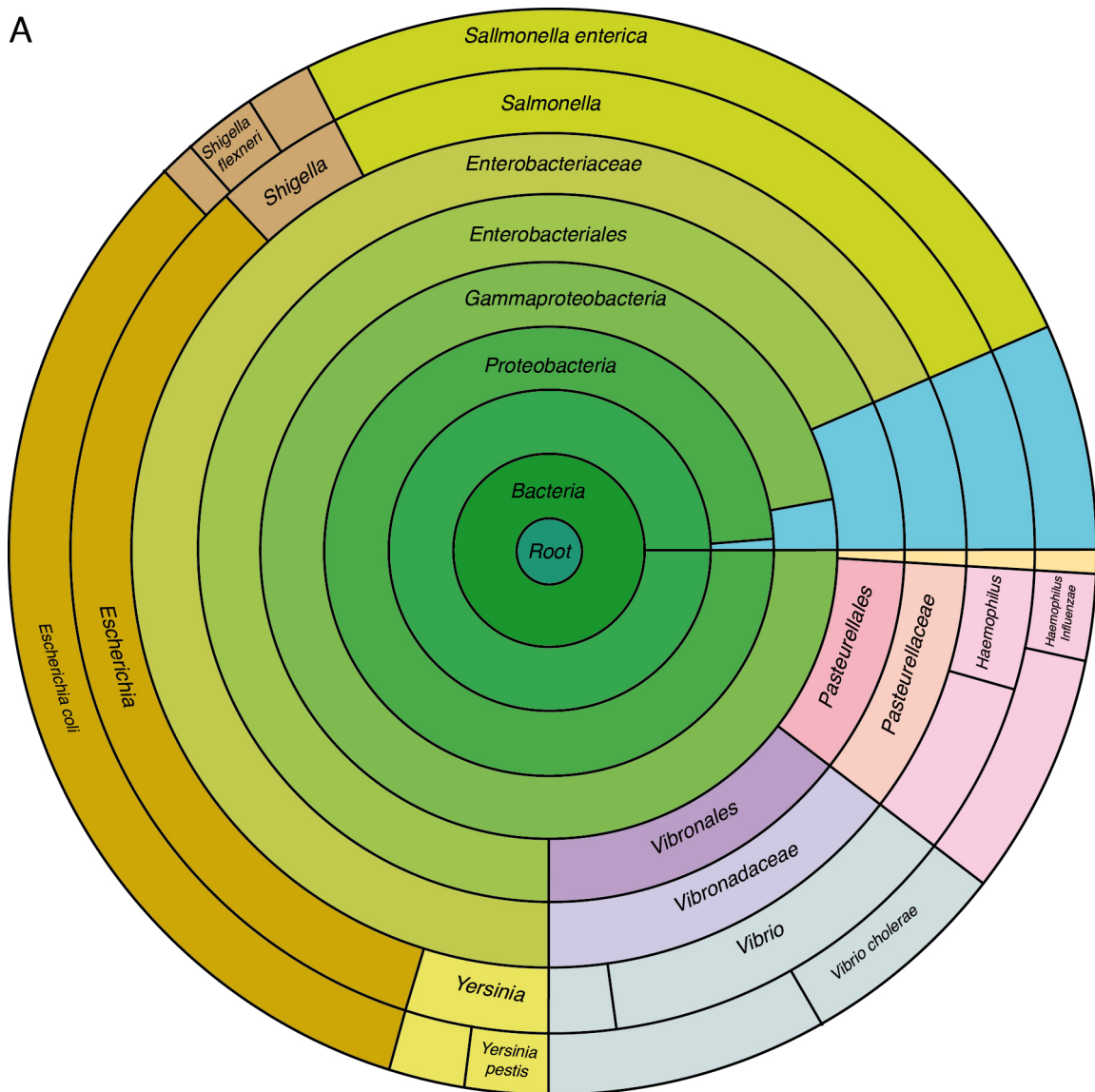


Figure S11. Changes upon compound **1** recognition in MltC. (A) Structural superimposition of the apo MltC (red cartoon) and the MltC·**1** complex (green cartoon) with the pentapeptide in green sticks (for carbon atoms). The binding of the disaccharide pentapeptide results in a small movement of the catalytic domain versus the N-terminal domain; however (B) a drastic movement is observed in Arg227 (labeled) allowing the perfect accommodation of the peptide. The residues showing relevant changes (Tyr119, Arg227) and the catalytic residue (Glu217) are represented as capped sticks.

A





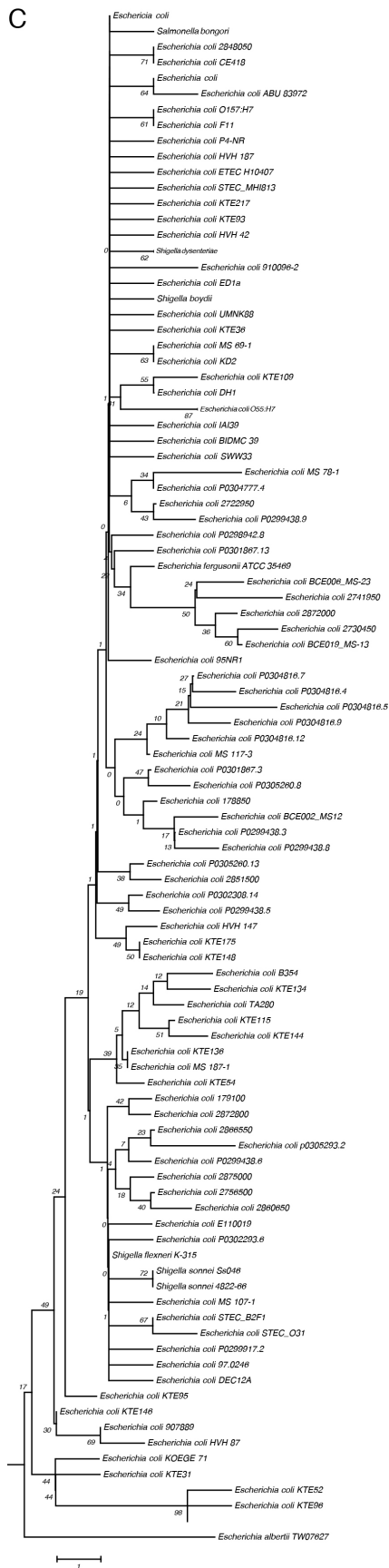


Figure S12. Distribution and Phylogeny of the DUF3393 domain. The N-terminal domain of MltC corresponds to the DUF3393 (Domain of Unknown Function 3393) in Pfam database. (A) Schematic representation of the DUF3393 presence in bacterial kingdom. The DUF3393 domain is widely conserved in almost all Gram-negative bacteria and appears in 791 different species and 814 sequences. Among them, 810 sequences present the MltC pattern (DUF3393 + transglycosylase catalytic domain) while in the remaining 4 sequences the DUF3393 domain is observed alone (three *Vibrio cholerae* strains and in one *Haemophilus influenzae* strain). However these 4 sequences are annotated as "fragment" so it is possible that will also follow the MltC pattern (<http://pfam.sanger.ac.uk/family/DUF3393#tabview=tab7>) (B) The phylogenetic dendogram of the Gammaproteobacteria class was inferred using the Neighbor-Joining method. The percentage of replicates threes in which the taxa associated together is shown next to the branches. The evolutionary distances were computed using the number of amino acid differences per sequence. The analysis involved 416 aminoacid sequences. Colored boxes match bacterial species in accordance with panel A. (C) Extended detail of the *Escherichia coli*/*Salmonella*/*Shigella* genus branch (red box in panel B). Evolutionary analyses were conducted in MEGA5 (Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., and Kumar S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739).

Table S1. Comparison of products with anhydrosugar and with reducing-end sugar from the reaction of the wild-type MltC with sacculus, followed by AmpDh3

Compounds containing anhydrosugars	Peak area ^a	Compounds containing reducing-end sugars	Peak area ^a	Ratio anhydro/reducing-end sugar
8	2,300,000	8'	120,000	19.2
9	1,900,000	9'	480,000	4.0
10	1,500,000	10'	760,000	2.0
11	1,200,000	11'	500,000	2.4
12	980,000	12'	500,000	2.0
13	700,000	13'	330,000	2.1
14	540,000	14'	220,000	2.5
15	340,000	15'	91,000	3.7
16	250,000	16'	66,000	3.8
17	130,000	17'	70,000	1.9
Sum^b	9,800,000	Sum^b	3,100,000	3.2

^aPeak areas from extracted-ion chromatograms. ^bSum of products of each category.

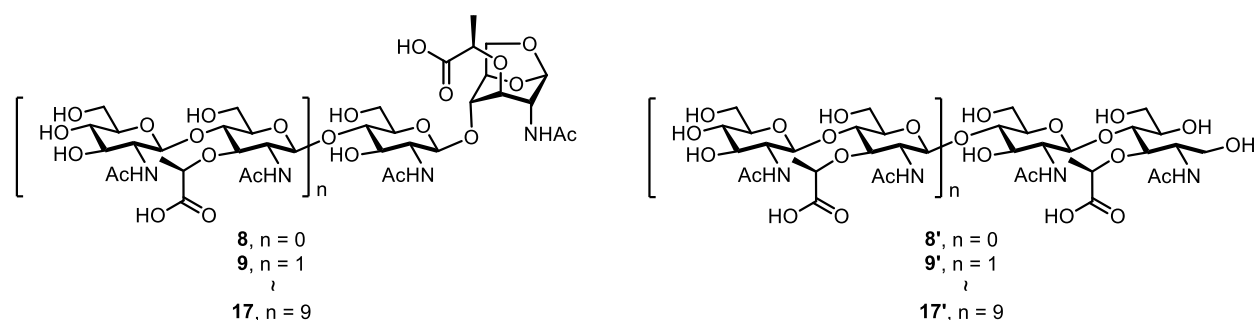


Table S2. Average molecular mass (M_r) of purified proteins.

	Wild-type MltC with His tag	Wild-type MltC without His tag	MltC-R227A	MltC-I59R
Theoretical	40,244	38,493	40,159	40,287
Measured	40,246 ± 4	38,495 ± 4	40,160 ± 4	40,289 ± 4

8.4. DISCUSIÓN.

MltC se ancla a la zona interna de la membrana externa mediante la acilación de una cisteína (Cys17). La zona inicial del extremo N-terminal (residuos 19-29) es una zona móvil y desordenada. Esto permite a la enzima una cierta movilidad circular en torno al enganche a la membrana, lo que dotaría a la enzima de una mayor capacidad de acción *in vivo*.

La estructura cristalográfica de MltC se resolvió *de novo* utilizando Arcimboldo. Este caso fue un verdadero desafío para este innovador programa ya que tuvo que resolver una proteína más grande que la MltE (700 residuos en la unidad asimétrica) y a una resolución media (2.5 Å). MltC presenta un módulo catalítico que comparte con la Slt70 y la MltE (residuos 183-359), y un dominio adicional (residuos 30-182) que juega un papel fundamental en el mecanismo de acción de la enzima. Este nuevo dominio nada tiene que ver con cualquier otro reportado para una LT de *E. coli*.

El complejo inactivo de MltC (E217Q) se cristalizó y resolvió en presencia de dos tetrasacáridos distintos. Los complejos muestran los azúcares estabilizados en las posiciones -1 a -4, situando al ácido catalítico Glu217 entre los sitios -1 y +1. Los resultados obtenidos están de acuerdo con lo esperado para una LT de la Familia 1. Los complejos con los tetrasacáridos han demostrado que el sitio de unión a azúcares de MltC puede extenderse gracias a la presencia del dominio N-terminal, que permitiría la estabilización de hasta 9 azúcares entre ambos dominios (desde -4 a +5). Esta extensión del sitio activo permite acoplar largas cadenas de PG y explicaría los resultados de los ensayos de actividad de la enzima en donde se observa una pequeña cantidad de actividad endolítica para MltC (0,5%), a pesar de ser una enzima esencialmente exolítica.

Además de estabilizar largas cadenas de PG, el nuevo dominio podría estar cumpliendo una función vital en el reconocimiento de péptidos. En la estructura del complejo MltC con el anhidrodisacárido pentapéptido se ve el péptido perfectamente estabilizado en el dominio adicional mientras que la parte glicánica parece estar desplazada una posición. El producto de la reacción esperado para esta enzima debería situarse entre los sitios -2 y -1, sin embargo, por la posición que ocupa el péptido sólo es posible que la parte anhidrodisacárida del ligando esté ocupando las posiciones -1 y +1. Estudios de dinámica molecular han apoyado esta teoría. Dado que la actividad de LT no permite el corte entre los azúcares NAG-NAM, el complejo obtenido representaría un intermedio en la traslocación de la cadena glicánica a las posiciones +1 y +2 para poder realizar su próxima ruptura. Este movimiento apuntaría a una actividad procesiva de MltC. En la literatura de las LTs se habla de que éstas actúan de forma procesiva aunque nunca se ha demostrado tal afirmación. El complejo con el producto de la reacción ha dado las claves esenciales en este sentido.

Análisis por espectrometría de masas de los productos de la reacción de MltC con el sáculo confirmaron que MltC necesita la presencia del péptido para

realizar la catálisis. La estructura de MltC y la disposición del dominio N-terminal imposibilita a la enzima para romper cadenas de PG que contengan enlaces entrecruzados, por lo menos en zonas de la bacteria en donde la red de PG se mantenga con una estructura rígida. Sin embargo, puesto que parte de los productos de MltC observados experimentalmente son fragmentos de peptidoglicano con enlaces cruzados, estos productos serían los derivados de la acción de MltC sobre cadenas de PG que no estén rígidas, es decir, que hayan sido procesadas previamente por otra enzima (probablemente otra LT).

Entre las estructuras cristalográficas de las formas apo y en complejo con los ligandos, la Arg227 cumplen un papel fundamental. Esta arginina ocupa una posición distinta en la forma apo y en complejo con los tetrasacáridos, que en la del complejo con el producto peptídico. En este último, la Arg227 está directamente aprisionando y estabilizando al péptido. Estos datos nos llevaron a postular un papel fundamental para la Arg227 en el mecanismo procesivo: sería la responsable de hacer avanzar los disacáridos del PG a lo largo del sitio de unión de la MltC y de soltar los productos de reacción a través de un movimiento que los libera al exterior.

La mutagénesis dirigida sobre R227A y I59R (isoleucina que interactúa con la cadena peptídica) y el posterior estudio de los productos de reacción de estos mutantes al digerir el sáculo confirmaron la procesividad del mecanismo exolítico de MltC. En ambos casos se demostró que la actividad de la enzima disminuye al impedir el sitio peptídico y que el producto exolítico mayoritario de MltC, el anhidrodisacárido, disminuye drásticamente. Por tanto, cuando el sitio peptídico está impedido no hay ruptura secuencial de la cadena de PG sino que una vez realizada la catálisis los productos son expulsados y de nuevo captados por otra molécula de MltC. Con estos resultados se concluye que la actividad exolítica de MltC es procesiva.

El dominio adicional del MltC, además de estabilizar cadenas largas de PG para realizar su función endolítica, cumple una función vital en el reconocimiento de péptidos que permite su actividad exolítica procesiva. Un estudio genómico mostró que este dominio adicional se repite en 791 genomas bacterianos, y está clasificado en la base de datos Pfam como DUF3393 (de sus siglas en inglés “domain of unknown function”). Esto sugiere que MltC es una enzima altamente conservada en las bacterias. Además, MltC podría estar involucrada en más funciones de las que inicialmente se le atribuyen por tratarse de una LT. Un ejemplo es el caso de *Salmonella enterica*, en la que la MltC está directamente implicada en la formación de biofilms, lo que está relacionado con la imposibilidad de rotación del flagelo.

Las conclusiones más importantes de este trabajo se resumen a continuación:

- Se ha resuelto la estructura cristalográfica de MltC, en su forma apo y en complejo con tres análogos de peptidoglicano distintos.
- MltC comparte el dominio catalítico con el mismo de la Familia 1 de LTs de *E. coli*, pero presenta un dominio adicional fundamental para su mecanismo catalítico y conservado en más de 790 especies bacterianas.
- Se han caracterizado los productos de reacción de MltC sobre sáculo purificado.
- Se ha analizado la función de los residuos R227 e I59 y se ha demostrado que MltE es una enzima procesiva en su mecanismo exolítico.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

9. CONCLUSIONES.

1. Se ha expresado, purificado y cristalizado la MltE de *E. coli*, y se ha obtenido un set de datos adecuado para su resolución estructural.
2. Se ha determinado *de novo* la estructura cristalográfica de la transglicosilasa lítica MltE de *E. coli*, utilizando el innovador programa Arcimboldo. El análisis estructural ha revelado que la enzima posee un plegamiento común con el dominio catalítico de la Slt70, aunque la comparación de ambas estructuras revela diferencias fundamentales a la hora de entender el mecanismo catalítico de MltE.
3. La estructura tridimensional ha demostrado cómo MltE se ancla a la parte interna de la membrana externa de la bacteria, a través de la acilación de la Cys15. La presencia de una hélice adicional respecto al dominio catalítico de la Slt70, formada en su mayoría por residuos básicos, determina la orientación de la proteína para interactuar con la membrana lipídica y la cadena de peptidoglicano.
4. El análisis estructural de la enzima, junto con ensayos de dinámica molecular han mostrado, por primera vez, una LT con más de seis sitios de unión a azúcares. MltE es capaz de acomodar hasta ocho azúcares, quedando estos sitios definidos desde -4 hasta +4. Con la estructura cristalográfica se ha propuesto un mecanismo de reacción único para la MltE, en el que se explican los productos obtenidos de forma experimental. Este mecanismo descubre la acción puramente endolítica de la enzima.
5. Se han determinado las estructuras tridimensionales de la amidasa periplásmica de *P. aeruginosa* AmpDh2, así como sus estructuras en complejos con el anhidromurámico pentapéptido y con un tetrasacárido. La comparación de las estructuras en sus formas apo y en complejo muestra pequeñas diferencias en la zona $\beta 5$ - $\beta 6$, así como un cambio en la posición del Trp85, fundamentales para acomodar los ligandos.
6. AmpDh2 ha demostrado ser un dímero en solución y en el cristal, y se encuentra anclada a la membrana por su extremo N-terminal. Su disposición dimérica es vital para definir el sitio activo de esta amidasa ya que hace posible extender en el segundo monómero el sitio de unión a péptidos, permitiendo la unión de fragmentos de peptidoglicano cruzados. Además, el complejo de AmpDh2 con un tetrasacárido muestra, por primera vez, una amidasa con sitio de unión a azúcares.

CONCLUSIONES

7. Se ha desvelado el funcionamiento y regulación *in vivo* de AmpDh2. La actividad de AmpDh2 está regulada por su localización celular. Dada su disposición dimérica, es capaz de fragmentar dos cadenas de peptidoglicano al mismo tiempo, pero su anclaje a la membrana limita su actividad a cadenas cercanas.
8. Se han determinado las estructuras cristalográficas de la amidasa periplásmica de *P. aeruginosa* AmpDh3, así como sus estructuras en complejos con el tetrasacárido pentapéptido y el 1,6-anhidromurámico pentapéptido.
9. AmpDh3 ha demostrado ser un tetrámero en solución y en el cristal. La estructura tetramérica se encuentra fuertemente unida entre sí a través de la zona N-terminal. En la unidad asimétrica de la estructura cristalográfica se encuentran dos monómeros, relacionados por simetría con los otros dos que forman el tetrámero.
10. La disposición tetramérica de AmpDh3 permite idear un mecanismo para esta enzima *in vivo*. El mecanismo propuesto muestra al tetrámero actuando “dos a dos”. Por tratarse de una macroestructura no anclada en la membrana, AmpDh3 puede adentrarse en el interior de las cadenas de peptidoglicano e hidrolizar los péptidos de una forma procesiva, explicando los productos de reacción obtenidos experimentalmente.
11. Se ha determinado *de novo* la estructura cristalográfica de la transglicosilasa lítica MltC de *E. coli*, así como su anclaje a la membrana. Los complejos obtenidos del mutante E217Q con varios análogos de PG han ayudado a entender el comportamiento de la enzima dentro de la bacteria.
12. Se ha identificado y asignado una función al dominio adicional de la MltC, altamente conservado en otras bacterias, y que ha resultado de vital importancia para demostrar, por primera vez, que la actividad exolítica de la enzima es procesiva y que este dominio adicional se encarga de estabilizar la parte peptídica de la cadena de PG.
13. La actividad endolítica encontrada para MltC también necesita de este nuevo dominio para poder llevarse a cabo, puesto que es el responsable de extender el sitio activo y permitir la degradación de largas cadenas de PG.

BIBLIOGRAFÍA

10. BIBLIOGRAFÍA.

1. Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkóczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L.-W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C. & Zwar, P. H. (2010). PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Cryst. D66*, 213-221.
2. Alcorn, T., & Juers, D.H., (2010). Progress in rational methods of cryoprotection in macromolecular crystallography. *Acta Cryst. D66*, 366-373.
3. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W. & Lipman D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.
4. Asselt, E. J. V., Dijkstra, A. J., Kalk, K. H., Takacs, B., Keck, W., & Dijkstra, B. W. (1999). Crystal structure of *Escherichia coli* lytic transglycosylase Slt35 reveals a lysozyme-like catalytic domain with an EF-hand. *Structure*, 7, 1167–1180.
5. Asselt, E. J. V., Kalk, K. H., & Dijkstra, B. W. (2000). Crystallographic Studies of the Interactions of *Escherichia coli* Lytic Transglycosylase Slt35 with Peptidoglycan. *Biochemistry*, 39, 1924–1934.
6. Baldock, P., Mills, V., & Stewart, P.S. (1996). A comparison of microbatch and vapour diffusion for initial screening of crystallization conditions. *J. Crystal Growth*, 168, 170-174.
7. Battye, G.G., Kontogiannis, L., Johnson O., Powell H. R. & Leslie A. G. W. (2011). iMOSFLM: a new graphical interface for diffraction-image processing with MOSFLMT. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 67, 271–281.
8. Blackburn, N. T., & Clarke, A. J. (2001). Identification of four families of peptidoglycan lytic transglycosylases. *Journal of Molecular Evolution*, 52(1), 78–84.
9. Blackburn, N.T. & Clarke, A.J. (2002). Characterization of soluble and membrane-bound family 3 lytic transglycosylases from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry*, 41, 1001-1013.
10. Boudreau, M.A., Fisher, J.F., Mobashery, S. (2012). Messenger functions of the bacterial cell wall-derived muropeptides. *Biochemistry* 51, 2974-2990.
11. Bouhss, A., Trunkfield, A.E., Bugg, T.D.H., & Mengin-Lecreulx, D. (2008). The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiol Rev.*, 32: 208–233.
12. Carrasco-López, C., Rojas-Altuve, A., Zhang, W., Heseck, D., Lee, M., Barbe, S., André, I., *et al.* (2011). Crystal structures of bacterial peptidoglycan amidase AmpD and an unprecedented activation mechanism. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(36), 31714–31722.
13. Cava, F., de Pedro, M. A., Lam, H., Davis, B. M., & Waldor, M. K. (2011). Distinct pathways for modification of the bacterial cell wall by non-canonical D-amino acids. *The EMBO Journal*, 30(16), 3442–3453.
14. Cava, F., Lam, H., Pedro, M. A., & Waldor, M. K. (2010). Emerging knowledge of regulatory roles of D-amino acids in bacteria. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(5), 817–831.
15. Chan, Y. A., Hackett, K. T., Dillard, J. P. (2012). The Lytic Transglycosylases of *Neisseria gonorrhoeae*. *Microb. Drug Resist.*, 18, 271–279.
16. Chayen, N.E. (1992). Microbatch crystallization under oil-a new technique allowing many small-volume crystallization trials. *Journal of Crystal Growth* 122176-180
17. Chen V. B., Arendall, W. B., Headd, J. J., Keedy, D. A., Immormino, R. M., Kapral, G. J., Murray, L. W., Richardson J. S. & Richardson D. C. (2010) MolProbity: all-atom structure validation for macromolecular crystallography. *Acta Crystallographica D66*, 12-21.

18. Clatworthy, A. E., Pierson, E., & Hung, D. T. (2007). Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature Chemical Biology*, 3(9), 541–548.
19. Cloud-Hansen, K. A., Peterson, S. B., Stabb, E. V., Goldman, W. E., McFall-Ngai, M. J., & Handelsman, J. (2006). Breaching the great wall: peptidoglycan and microbial interactions. *Nat. Rev. Microbiol.*, 4, 710–716.
20. Davies, G. & Henrissat, B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*, 3, 853–859.
21. Dijkstra, A. J., & Keck, W. (1996). Peptidoglycan as a barrier to transenvelope transport. *J. Bacteriol.* 178, 5555–5562.
22. Dijkstra, A.J., Hermann, F., & Keck, W. (1995). Cloning and controlled over- expression of the gene encoding the 35 kDa soluble lytic transglycosylase from *Escherichia coli*. *FEBS Lett.*, 366, 115–118.
23. Ehlert, K., Höltje, J.V. & Templin, M.F. (1995). Cloning and expression of a murein hydrolase lipoprotein from *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 16, 761–768.
24. Emsley, P., Lohkamp, B., Scott, W.G. & Cowtan, K. (2010). Features and Development of Coot. *Acta Crystallographica D* 66, 486–501.
25. Engel, H., Kazemier, B., & Keck, W. (1991). Murein-metabolizing enzymes from *Escherichia coli*: sequence analysis and controlled overexpression of the *slt* gene, which encodes the soluble lytic transglycosylase. *J. Bacteriol.*, 173(21), 6773–6782.
26. Engel, H., Smink, A.J., van Wijngaarden, L., & Keck, W., (1992). Murein- metabolizing enzymes from *Escherichia coli*: existence of a second lytic transglycosylase. *J. Bacteriol.* 174, 6394–6403.
27. Fisher, J. F., Meroueh, S. O., & Mobashery, S. (2005). Bacterial Resistance to β -Lactam Antibiotics: Compelling Opportunism, Compelling Opportunity . *Chemical Reviews*, 105(2), 395–424.
28. French G.S. & Wilson K.S. (1978) *Acta. Cryst.*, A34, 517.
29. Garman, E. F. & Owen, R. L. (2006) Cryocooling and radiation *damage* in macromolecular crystallography. *Acta Cryst. D* 62, 32–47.
30. Génèreux, C., Dehareng, D., Devreese, B., Beeumen, J., Frère, J.M. & Joris, B. (2004). Mutational analysis of the catalytic centre of the *Citrobacter freundii* AmpD N-acetylmuramyl-L-Alanine amidase. *Biochem. J.*, 377, 111–120.
31. Goodell, E.W. (1985). Recycling of murein by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 163, 305–310.
32. Hassell, A. M., Gang, A., Bledsoe, R. K., Bynum, J. M. *et al.*, (2007) Crystallization of protein–ligand complexes. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 63, 72–79.
33. Heidrich, C., Ursinus, A., Berger, J., Schwarz, H., & Höltje, J. V. (2002). Effects of Multiple Deletions of Murein Hydrolases on Viability, Septum Cleavage, and Sensitivity to Large Toxic Molecules in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 184(22), 6093–6099.
34. Heijenoort, J., Park, J.T., Normark, S. & Frère, J.M. (1995). AmpD, essential for both β -lactamase regulation and cell wall recycling, is a novel cytosolic N-acetylmuramyl-L-Alanine amidase. *Mol. Microbiol.* 15, 553–559.
35. Herbold DR & Glaser L (1975) Interaction of N-acetylmuramic acid L-alanine amidase with cell wall polymers. *J. Biol. Chem.* 250, 7231–7238.
36. Höltje, J. V. (1998). Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62(1), 181–203.

BIBLIOGRAFÍA

37. Høltje, J.-V. (1996). A hypothetical holoenzyme involved in the replication of the murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiology* 142, 1911-1918.
38. Høltje, J.-V., Mirelman, D., Sharon, N., & Schwarz, U. (1975). Novel type of murein transglycosylase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 124, 1067-1076.
39. Höppner, C., Carle, A., Sivanesan, D., Hoepfner, S., & Baron, C. (2005). The putative lytic transglycosylase VirB1 from *Brucella suis* interacts with the type IV secretion system core components VirB8, VirB9 and VirB11. *Microbiology*, 151, 3469-3482.
40. Jacobs, C., Frère, J.M., & Normark, S. (1997). Cytosolic intermediates for cell wall biosynthesis and degradation control inducible β -lactam resistance in Gram-negative bacteria. *Cell*, 88, 823-832.
41. Jacobs, C., Joris, B., Jamin, M., Klarsov, K., Van Beeumen, J., Mengin-Lecreulx, D., van Johnson, J. W., Fisher, J. F., & Mobashery, S. (2013). Bacterial cell-wall recycling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1277(1), 54-75.
42. Juan, C., Maciá, M. D., Gutiérrez, O., Vidal, C., Pérez, J. L., & Oliver, A. (2005). Molecular mechanisms of β -lactam resistance mediated by AmpC hyperproduction in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 4733-4738.
43. Juan, C., Moya, B., Perez, J. L., & Oliver, A., (2006). Stepwise upregulation of the *Pseudomonas aeruginosa* chromosomal cephalosporinase conferring high-level β -lactam resistance involves three AmpD homologues. *Antimicrob Agents Chemother.*, 50(5), 1780-1787.
44. Kabsch, W. (2010). XDS. *Acta Cryst. D* 66, 125-132.
45. Koraimann, G. (2003). Lytic transglycosylases in macromolecular transport systems of Gram-negative bacteria. *Cell. Mol. Life Sci.*, 60, 2371-2388.
46. Kraft, A.R., Templin, M.F., & Høltje, J.V. (1998). Membrane-Bound Lytic Endotransglycosylase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, 180(13), 3441-3447.
47. Lam, H., Oh, D. C., Cava, F., Takacs, C. N., Clardy, J., de Pedro, M. A., & Waldor, M. K. (2009). D-Amino Acids Govern Stationary Phase Cell Wall Remodeling in Bacteria. *Science*, 325(5947), 1552-1555.
48. Langaee, T. Y., Cagnon L., & Huletsky A., (2000). Inactivation of the *ampD* gene in *Pseudomonas aeruginosa* leads to moderate basal level and hyperinducible AmpC β -lactamase expression. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44, 583-589.
49. Larkin M.A., Blackshields G., Brown N.P., Chenna R., McGettigan P.A., McWilliam H., Valentin F., Wallace I.M., Wilm A., Lopez R., Thompson J.D., Gibson T.J. & Higgins D.G. (2007) ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* 23(21), 2947-2948.
50. Laskowski, R. A., Macarthur, M. W., Moss, D. S., & Thornton, J. M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.*, 26, 283-291.
51. Lee, M., Hesek, D., Llarrull, L. I., Lastochkin, E., Pi, H., Boggess, B., & Mobashery, S. (2013). Reactions of All *Escherichia coli* Lytic Transglycosylases with Bacterial Cell Wall. *Journal of the American Chemical Society*, 135(9), 3311-3314.
52. Leslie A.G.W. & H.R. Powell (2007),. Processing Diffraction Data with Mosflm. *Evolving Methods for Macromolecular Crystallography*, 245, 41-51.
53. Lindberg, F., S. Lindquist, & S. Normark. (1987). Inactivation of the *ampD* gene causes semiconstitutive overproduction of the inducible *Citrobacter freundii* β -lactamase. *J. Bacteriol.* 169, 1923-1928.

-
54. Lindberg, F., Westman, L., & Normark, S., (1985). Regulatory components in *Citrobacter freundii* ampC beta-lactamase induction. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 82(14), 4620-4624.
 55. Lindquist, S., Galleni, M., Lindberg, F., & Normark, S., (1989). Signalling proteins in enterobacterial AmpC β -lactamase regulation. *Molecular Microbiology*, 3, 1365-2958.
 56. Livermore, D. M. (1987). Clinical significance of β -lactamase induction and stable derepression in gram-negative rods. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 6, 439-445.
 57. Livermore, D. M. (1995). β -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 8, 557-584
 58. Lommatzsch, J., Templin, M.F., Kraft, A. R., Vollmer, W., & Höltje, J.V. (1997). Outer Membrane Localization of Murein Hydrolases: MltA, a Third Lipoprotein Lytic Transglycosylase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*, 179(17), 5465–5470.
 59. Malott, R.J., Keller, B.O., Gaudet, R.G., McCaw, S.E., Lai, C.C., Dobson-Belaire, W.N., Hobbs, J.L., St Michael, F., Cox, A.D., Moraes, T.F., & Gray-Owen, S.D. (2013). *Neisseria gonorrhoeae*-derived heptose elicits an innate immune response and drives HIV-1 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 110(25), 10234–10239.
 60. Matthews, B.W. (1968) Solvent content of protein crystals. *J Mol Biol* 33, 491-497.
 61. Mohammadi, T., van Dam, V., Sijbrandi, R., Vernet, T., Zapun, A. E., Bouhss, A., Bruin, M. D.-D., *et al.* (2011). Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane. *The EMBO Journal*, 30(8), 1425–1432.
 62. Moya, B., Juan, C., Alberti, S., Perez, J. L., & Oliver, A. (2008). Benefit of Having Multiple ampD Genes for Acquiring β -Lactam Resistance without Losing Fitness and Virulence in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52(10), 3694–3700.
 63. Moynihan, P. J., & Clarke, A. J. (2011). O-Acetylated peptidoglycan: Controlling the activity of bacterial autolysins and lytic enzymes of innate immune systems. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 43(12), 1655–1659.
 64. Murshudov, G.N., Vagin, A.A., & Dodson, E.J. (1997). Refinement of Macromolecular Structures by the Maximum-Likelihood Method. *Acta Cryst. D* 53, 240-255.
 65. Normark, S. (1995). β -Lactamase induction in Gram-negative bacteria is intimately linked to peptidoglycan recycling. *Microb. Drug Resist.* 1,111-114.
 66. Park, J. T., & Uehara, T. (2008). How Bacteria Consume Their Own Exoskeletons (Turnover and Recycling of Cell Wall Peptidoglycan). *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72(2), 211–227.
 67. Park, J.T. (1993). Turnover and recycling of the murein sacculus in oligopeptide permease-negative strains of *Escherichia coli*: indirect evidence for an alternative system and for a monolayered sacculus. *J Bacteriol* 175, 7-11.
 68. Reith, J., & Mayer, C. (2011). Peptidoglycan turnover and recycling in Gram-positive bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(1), 1–11.
 69. Rodríguez, D., Sammito, M., Meindl, K., de Ilarduya, I.M., Potratz, M., Sheldrick, G.M., & Usón, I. (2012). Practical structure solution with ARCIMBOLDO. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 68, 336-343.
 70. Romeis, T., & Höltje, J.V. (1994). Specific interaction of penicillin-binding proteins 3 and 7/8 with soluble lytic transglycosylase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 269, 21603–21607.
 71. Romeis, T., Vollmer, W., & Holtje, J. (1993). Characterization of three different lytic transglycosylases in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 111, 141–146.

72. Robinson, K.A., Ladner, J.E., Tordova, M. & Gilliland, G.L. (2000) Cryosalts: suppression of ice formation in macromolecular crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **56**, 996-1001.
73. Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, K., Ayala, J.A., Charlier, P. (2008). The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**(2), 324-258
74. Scheurwater, E., Reid, C. W., & Clarke, A. J. (2008). Lytic transglycosylases: bacterial space-making autolysins. *The international journal of biochemistry & cell biology*, **40**(4), 586–591.
75. Sudiarta I. P., Fukushima T., Sekiguchi J.,(2010). *Bacillus subtilis* CwlQ (previously YjbJ) is a bifunctional enzyme exhibiting muramidase and soluble-lytic transglycosylase activities. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **398**, 606-612.
76. Suvorov, M., Fisher, J. F., & Mobashery, S. Bacterial Cell Wall: Morphology and Biochemistry. In *Practical Handbook of Microbiology*, 2nd ed.; Goldman, E., Green, L. H., Eds.; CRC Press: 2008; 153-183.
77. Suvorov, M., Lee, M., Hesek, D., Boggess, B., & Mobashery, S. (2008). Lytic Transglycosylase MltB of *Escherichia coli* and Its Role in Recycling of Peptidoglycan Strands of Bacterial Cell Wall. *Journal of the American Chemical Society*, **130**, 11878–11879.
78. Taylor, A., & Gorazdowska, M. (1974). Conversion of murein to non-reducing fragments by enzymes from phage lambda and Vi II lysates. *Biochim Biophys Acta*, **342**, 133–136.
79. Templin, M. F., Edwards, D.H., & Höltje, J.V. (1992). A murein hydrolase is the specific target of bulgecin in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**: 20039–20043.
80. Thunnissen, A.M., Rozeboom, H. J., Kalk, K.H., & Dijkstra, B.W. (1995). Structure of the 70-kDa Soluble Lytic Transglycosylase Complexed with Bulgecin A. Implications for the Enzymatic Mechanism. *Biochemistry*, **34**, 12729–12737.
81. Thunnissen, A.M., W. H., Isaacs, N.W., & Dijkstra, B.W., (1995). The catalytic domain of a lytic bacterial transglycosylase defines a novel class of lysozymes. *Proteins* **22**(3), 245–258.
82. Ursinus, A., & Höltje, J.V. (1994). Purification and properties of a membrane-bound lytic transglycosylase from *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **176**(2), 338–343.
83. Vagin, A. & Teplyakov, A. (1997). MOLREP: an automated program for molecular replacement, *J. Appl. Cryst.* **30**, 1022-1025.
84. van Asselt, E. J., Thunnissen, A. M., & Dijkstra, B. W. (1999). High resolution crystal structures of the *Escherichia coli* lytic transglycosylase Slt70 and its complex with a peptidoglycan fragment. *Journal of Molecular Biology*, **291**(4), 877–898.
85. van Heijenoort, J. (2011). Peptidoglycan Hydrolases of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **75**(4), 636–663.
86. Van Straaten, K. E., Barends, T. R. M., Dijkstra, B. W., & Thunnissen, A.-M. (2007). Structure of *Escherichia coli* Lytic Transglycosylase MltA with Bound Chitohexaoase. *Journal of Biological Chemistry*, **287**(29), 21197–21205.
87. Van Straaten, K. E., Dijkstra, B. W., Vollmer, W., & Thunnissen, A.-M. (2005). Crystal structure of MltA from *Escherichia coli* reveals a unique lytic transglycosylase fold. *Journal of Molecular Biology*, **352**(5), 1068–1080.
88. Vollmer, W. (1999). Demonstration of Molecular Interactions between the Murein Polymerase PBP1B, the Lytic Transglycosylase MltA, and the Scaffolding Protein MipA of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, **274**(10), 6726–6734.
89. Vollmer, W., Blanot, D., & de Pedro, M. A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*, **32**(2), 149–167.

90. Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P., & Foster, S. (2008). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiol Rev* 32, 259-286.
91. von Rechenberg, M., Ursinus, A. & Höltje, J.V. (1996). Affinity chromatography as a means to study multienzyme complexes involved in murein synthesis. *Microb. Drug Resist.* 2, 155-157.
92. Weidenmaier, C., & Peschel, A. (2008). Teichoic acids and related cell-wall glycopolymers in Gram-positive physiology and host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, 6(4), 276–287.
93. White, A. & Rose, D. R. (1997). Mechanism of catalysis by β -glycosyl hydrolases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7, 645-651.
94. Winn M. D., Ballard, C. C., Cowtan, K. D., Dodson, E. J. *et al.* (2011). Overview of the CCP4 suite and current developments *Acta. Cryst. D* 67, 235-242.
95. Zhang, W., Lee, M., Heseck, D., Lastochkin, E., Boggess, B., & Mobashery, S. (2013). Reactions of the Three AmpD Enzymes of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the American Chemical Society*, 135(13), 4950–4953.
